

20. Jan. 2001 ✓

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

Abseher: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

Hertz, Oliver
VON BEZOLD & SOZIEN
Akademiestrasse 7
D-80799 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN

23. Okt. 2000

v. Bezold & Sozien

PCT

SCHRIFTLICHER BESCHIED
(Regel 66 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

20.10.2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

15129/PCT Ri

ANTWORT FÄLLIG innerhalb von **3 Monat(en)**
ab obigem Absendedatum

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP00/01806

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

02/03/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

02/03/1999

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK

G02B21/00

Anmelder

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ...

- Dieser Bescheid ist der **erste** schriftliche Bescheid der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte B hörde
- Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- | | | |
|------|-------------------------------------|---|
| I | <input checked="" type="checkbox"/> | Grundlage des Bescheides |
| II | <input type="checkbox"/> | Priorität |
| III | <input type="checkbox"/> | Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit |
| IV | <input type="checkbox"/> | Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung |
| V | <input type="checkbox"/> | Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung |
| VI | <input type="checkbox"/> | Bestimmte angeführte Unterlagen |
| VII | <input checked="" type="checkbox"/> | Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung |
| VIII | <input checked="" type="checkbox"/> | Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung |

- Der Anmelder wird **aufgefordert**, zu diesem Bescheid **Stellung zu nehmen**

Wann? Siehe oben genannte Frist. Der Anmelder kann vor Ablauf dieser Frist bei der Behörde eine Verlängerung beantragen, siehe Regel 66.2 d).

Wie? Durch Einreichung einer schriftlichen Stellungnahme und gegebenenfalls von Änderungen nach Regel 66.3. Zu Form und Sprache der Änderungen, siehe Regeln 66.8 und 66.9.

Dazu: Hinsichtlich einer zusätzlichen Möglichkeit zur Einreichung von Änderungen, siehe Regel 66.4. Hinsichtlich der Verpflichtung des Prüfers, Änderungen und/oder Gegenvorstellungen zu berücksichtigen, siehe Regel 66.4 bis. Hinsichtlich einer formlosen Erörterung mit dem Prüfer, siehe Regel 66.6.

Wird keine Stellungnahme eingereicht, so wird der internationale vorläufige Prüfungsbericht auf der Grundlage dieses Bescheides erstellt.

- Der Tag, an dem der internationale vorläufige Prüfungsbericht gemäß Regel 69.2 spätestens erstellt sein muß, ist der: 02/07/2001.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragte Behörde:



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter / Prüfer

Narganes-Quijano, F

Formalsachbearbeiter (einschl. Fristverlängerung)

Maier, E
Tel. +49 89 2399 2230



THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Bescheids

1. Dieser Bescheid wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Bescheids als "ursprünglich eingereicht".*):

Beschreibung, Seiten:

1-36 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-23 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/8-8/8 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. Dieser Bescheid ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USP 10)

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

1. Die unabhängigen Ansprüche 1 und 14 sind nicht in der zweiteiligen Form nach Regel 6.3 b) PCT abgefaßt. Im vorliegenden Fall erscheint die Zweiteilung jedoch zweckmäßig. Folglich sollten die aus dem Dokument WO9706509 A bekannten Merkmale im Oberbegriff zusammengefaßt (Regel 6.3 b) i) PCT) und die übrigen Merkmale im kennzeichnenden Teil aufgeführt werden (Regel 6.3 b) ii) PCT).

Im vorliegenden Fall sind die folgenden Merkmale aus dem Dokument WO9706509 A bekannt und gehören daher in den Oberbegriff eines solchen Anspruchs:

- ein optisches Abbildungssystem (siehe Fig. 1, Seite 1, Zeile 26 - Seite 3, Zeile 27 und Seite 4, Zeile 16 - Seite 5, Zeile 26) mit einer Beleuchtungseinrichtung (Seite 5, Zeilen 3-4) und einer Detektoreinrichtung (Seite 5, Zeilen 2-6), die dazu eingerichtet sind, ein Objekt zu beleuchten bzw. eine Abbildung des Objekts aufzunehmen (Fig. 1);
- eine Mustergenerator zur Erzeugung eines veränderlichen räumlichen Musters von Objektbedingungen am Objekt (Seite 5, Zeilen 16-26), wobei die Beleuchtungseinrichtung und der Mustergenerator dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das mit der Detektoreinrichtung detektierbare Licht abhängig ist; und
- ein Bildgenerator zur Rekonstruktion einer Objektabbildung aus Bildern, die mit der Detektoreinrichtung aufgenommen worden sind (Seite 5, Zeilen 6-15).

2. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument WO9706509 A offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.
3. Die auf Seite 36, Zeilen 8-12 der Beschreibung spezifizierten Ausgestaltungen, die sich auf "beliebige Kombinationen" von Merkmalen basieren, sind nicht klar. Eine solche Unklarheit läßt Zweifel über den Schutzbereich entstehen und damit

THIS PAGE BLANK (USPTO)

die Klarheit der Patentansprüche beeinträchtigen.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Die Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 6 PCT, weil die Ansprüche aus folgenden Gründen nicht klar sind:

i) Die Formulierung des Anspruchs 1 bzw. Anspruchs 14 bringt nicht die als wesentliche angesehene Tatsache zum Ausdruck, daß die Rekonstruktion der Objektabbildung unter Berücksichtigung der nicht-linearen optischen Effekten erfolgt. Nur dann erscheint es möglich, das räumliche Auflösungsvermögen zu erhöhen, siehe Seite 6, Zeilen 16-25 der Beschreibung.

ii) Die im Anspruch 23 spezifizierten "herkömmlichen" optischen Mikroskopieverfahren sind nicht klar und nicht einschränkend. Daher sollten die Ausdrücke "herkömmlichen" und "insbesondere" im Anspruch 23 gestrichen werden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



✉ EPA/EPO/OEB
D-80298 München
☎ +49 89 2399-0
TX 523 656 epmu d
FAX +49 89 2399-4465

Europäisches
Patentamt

Generaldirektion 2

European
Patent Office

Directorate General 2

Office européen
des brevets

Direction Générale 2

Schriftverkehr mit dem EPA bei PCT Kapitel II Anträgen

Um sicherzustellen, daß Ihr PCT Kapitel II Antrag so rasch wie möglich behandelt werden kann, werden Sie gebeten die beigefügten Klebeschilder bei allen an das EPA München gerichteten Schriftstücken zu verwenden.

Eines dieser Klebeschilder sollte an gut erkennbarer Stelle am oberen Rand der Titelseite des jeweiligen Schreibens angebracht werden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

REC'D 01 MAR 2001

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT


(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15129/PCT Ri	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01806	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02/03/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 02/03/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G02B21/00		
Anmelder MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ...		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 23/08/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 27.02.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Narganes-Quijano, F Tel. Nr. +49 89 2399 2348



THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlag des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-36 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

2-13,15-22 ursprüngliche Fassung

1,14,23 eingegangen am 17/01/2001 mit Schreiben vom 17/01/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/8-8/8 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01806

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Unter den im Recherchenbericht angegebenen Dokumenten sind die folgenden Dokumente in diesem Bescheid genannt:

D1 = WO9706509 A

D2 = WO9711355 A

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Das Dokument D1 wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1 bzw. 14 angesehen. D1 offenbart ein optisches Abbildungssystem (siehe Fig. 1, Seite 1, Zeile 26 - Seite 3, Zeile 27 und Seite 4, Zeile 16 - Seite 5, Zeile 26) mit einer Beleuchtungseinrichtung (Seite 5, Zeilen 3-4) und einer Detektoreinrichtung (Seite 5, Zeilen 2-6), die dazu eingerichtet sind, ein Objekt zu beleuchten bzw. eine Abbildung des Objekts aufzunehmen (Fig. 1). Außerdem enthält das optische Abbildungssystem einen Mustergenerator zur Erzeugung eines veränderlichen räumlichen Musters von Objektbedingungen am Objekt (Seite 5, Zeilen 16-26), wobei die Beleuchtungseinrichtung und der Mustergenerator dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das mit der Detektoreinrichtung detektierbare Licht abhängig ist, und einen Bildgenerator zur Rekonstruktion einer Objektabbildung aus Bildern, die mit der Detektoreinrichtung aufgenommen worden sind (Seite 5, Zeilen 6-15).
- 1.1 Der Gegenstand nach Anspruch 14 unterscheidet sich von diesem Stand der Technik dadurch, daß das mit der Detektoreinrichtung detektierbare Licht von den erzeugten Objektbedingungen nicht-linear abhängig ist.

Optische Abbildungssysteme auf der Basis nicht-linearer optischer Effekte sind in dem Stand der Technik bekannt, siehe z.B. Dokument D2 (Zusammenfassung)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

und Seite 4, Zeilen 18-28 der Beschreibung der vorliegenden Anmeldung. Kein Dokument des Standes der Technik gibt jedoch eine Anregung zur Verwendung nicht-linearer optischer Effekte in Abbildungsverfahren nach Dokument D1, die zu einer erheblichen Erhöhung des räumlichen Auflösungsvermögens führt, siehe Seite 6, Zeilen 3-29 der Beschreibung.

Daher erfüllt Anspruch 14 die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT.

- 1.2 Anspruch 1 bezieht sich auf das entsprechende optische Abbildungsverfahren. Somit erfüllt auch Anspruch 1 die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT.
2. Die abhängigen Ansprüche 2-13 und 15-22 sind auf vorteilhafte Ausgestaltungen des Abbildungsverfahrens nach Anspruch 1 bzw. des Abbildungssystems nach Anspruch 14 gerichtet und erfüllen auch die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT.
3. Anspruch 23 bezieht sich auf die Verwendung des im Anspruch 1 definierten Verfahrens bzw. des im Anspruch 14 definierten optischen Systems in Kombination mit optischen Mikroskopieverfahren bzw. mit den entsprechenden optischen Mikroskopanordnungen. Somit erfüllt auch Anspruch 1 die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.
3. Die auf Seite 36, Zeilen 8-12 der Beschreibung spezifizierten Ausgestaltungen, die sich auf "beliebige Kombinationen" von Merkmalen basieren, sind nicht klar.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Eine solche Unklarheit läßt Zweifel über den Schutzbereich entstehen und damit die Klarheit der Patentansprüche beeinträchtigen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Aktenzeichen: PCT/EP00/01806

15129/PCT Hz/ap

Anmelder: Max-Planck-Gesellschaft

17.01.2001

Patentansprüche 1, 14 und 23

1. Verfahren zur Gewinnung einer Objektabbildung mindestens eines Objekts (40), wobei mindestens zwei Teilbilder des Objekts (40) unter jeweils verschiedenen Objektbedingungen aufgenommen werden, die am Objekt mit räumlichen Mustern ausgebildet sind, und aus den Teilbildern die gewünschte Objektabbildung ermittelt wird,

dadurch gekennzeichnet, dass

die räumlichen Muster so ausgebildet sind, dass die Teilbilder unterschiedliche Beiträge verschiedener Raumfrequenzanteile der Objektstruktur enthalten und jeweils für einen Objektpunkt eine nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt her detektierten Lichtes von den am Objektpunkt gegebenen Bedingungen besteht, und

die Ermittlung der Objektabbildung unter Ausnutzung der nicht-linearen Abhängigkeit des detektierten Lichtes von den jeweiligen Objektbedingungen erfolgt.

14. Optisches Abbildungssystem (100) mit:

- einer Beleuchtungseinrichtung (10) und einer Detektoreinrichtung (60), die dazu eingerichtet sind, ein Objekt (40) zu beleuchten bzw. eine Abbildung des Objekts (40) oder von Teilen des Objekts (40) aufzunehmen,
- mindestens einem Mustergenerator (20, 20', 20'') zur Erzeugung mindestens eines veränderlichen räumlichen Musters von Objektbedingungen am Objekt (40), wobei die Beleuchtungseinrichtung (10) und/oder der Mustergenerator (20, 20', 20'') dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das mit der Detektoreinrichtung (60) detektierbare Licht abhängig ist, und

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- einem Bildgenerator (70) zur Rekonstruktion einer Objektabbildung aus Teilbildern, die mit der Detektoreinrichtung (60) aufgenommen worden sind,

dadurch gekennzeichnet, dass

- die Beleuchtungseinrichtung (10) und/oder der Mustergenerator (20, 20', 20'') dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das detektierbare Licht nicht-linear abhängig ist, und

- der Bildgenerator (70) zur Rekonstruktion der Objektabbildung unter Verwendung der nicht-linearen Abhängigkeit des detektierbaren Lichtes von den Objektbedingungen ausgelegt ist.

23. Verwendung eines Verfahrens oder eines optischen Systems gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Kombination mit optischen Mikroskopieverfahren, insbesondere in Kombination mit der Standard-Fernfeldmikroskopie, der Epifluoreszenzmikroskopie, der Konfokalmikroskopie, der 4Pi-Mikroskopie, der Theta-Mikroskopie, der Nahfeldmikroskopie, mikroskopischen I^2M -, I^3M - und I^5M -Verfahren, STED-Verfahren, Multiphotonenmikroskopie, CARS-Verfahren und SHG- oder THG-Mikroskopie.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3

Applicant's or agent's file reference 15129/PCT Ri	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/01806	International filing date (day/month/year) 02 March 2000 (02.03.00)	Priority date (day/month/year) 02 March 1999 (02.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G02B 21/00		
Applicant MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 August 2000 (23.08.00)	Date of completion of this report 27 February 2001 (27.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/01806

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-36, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 2-13,15-22, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1,14,23, filed with the letter of 17 January 2001 (17.01.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/8-8/8, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/01806

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following search report citations are mentioned in this report:

D1 = WO-A-97/06509

D2 = WO-A-97/11355

- D1 is regarded as the prior art closest to the subject matter of Claims 1 and 14. D1 discloses an optical imaging system (see Fig. 1, page 1, line 26 - page 3, line 27 and page 4, line 16 - page 5, line 26) with a lighting device (page 5, lines 3-4) and a detector device (page 5, lines 2-6) which are arranged to illuminate an object and record an image of the object (Fig. 1). Moreover, the optical imaging system comprises a pattern generator for the production of a variable, spatial pattern of object conditions on the object (page 5, lines 16-26), with the lighting device and the pattern generator being arranged to produce object conditions, on which the light which can be detected by the detector unit depends, and an image generator for reconstructing object imaging from images which have been recorded with the detector device (page 5, lines 6-15).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 1.1 The subject matter of Claim 14 differs from this prior art in that the light which can be detected by the detector device is non-linearly dependent on the object conditions produced.

Optical imaging systems based on non-linear optical effects are known in the prior art; see e.g. D2 (abstract) and page 4, lines 18-28 of the description of the present application. None of the prior art documents, however, suggests using non-linear optical effects in imaging methods according to D1, which leads to a significant increase in the spatial resolution - see page 6, lines 3-29 of the description.

Claim 14 therefore meets the requirements of PCT Article 33(1).

- 1.2 Claim 1 refers to the corresponding optical imaging method. Claim 1 therefore also meets the requirements of PCT Article 33(1).
2. Dependent Claims 2-13 and 15-22 are directed towards advantageous embodiments of the imaging method according to Claim 1 and the imaging system according to Claim 14 and therefore also meet the requirements of PCT Article 33(1).
3. Claim 23 refers to the use of the method defined in Claim 1 and of the optical system defined in Claim 14 in combination with optical microscope methods and the corresponding microscopy arrangements. Claim 23 therefore also meets the requirements of PCT Article 33(1).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite D1 or indicate the relevant prior art disclosed therein.
2. The embodiments specified on page 36, lines 8-12 of the description, which are based on "any desired combination" of features, are not clear.
Such a lack of clarity leads to doubt as regards the scope of protection and therefore impairs the clarity of the claims.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P. ENT COOPERATION TREA

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 11 October 2000 (11.10.00)	
International application No. PCT/EP00/01806	Applicant's or agent's file reference 15129/PCT Ri
International filing date (day/month/year) 02 March 2000 (02.03.00)	Priority date (day/month/year) 02 March 1999 (02.03.99)
Applicant HEINTZMANN, Rainer et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

23 August 2000 (23.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer F. Baechler
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15129/US Hz/hr

PATENT CLAIMS 1, 14, and 23 (as amended during
PCT Chapter II procedure)

1. Process for obtaining an object image of at least one object (40), wherein at least two partial images of the object (40) are taken under differing object conditions which are formed on the object with spatial patterns, and the desired object image is determined from the partial images characterized in that the spatial patterns are implemented in such a way that the partial images contain different contributions of various space frequency components of the object structure and a non-linear dependence of the light detectable from a current object point on the object conditions obtaining at the object point exists, and the determination of the object image is performed using the non-linear dependence of the detected light on the respective object conditions.

14. Optical imaging system (100) having:
 - an illumination device (10) and a detector device (60) which are set up for illuminating an object (40) and for recording an image of the object (40) or of parts of the object (40),
 - at least one pattern generator (20, 20', 20'') for generating at least one changeable spatial pattern of object conditions on the object (40), with the illumination device (10) and/or the pattern generator (20, 20', 20'') being set up for generating object conditions on which the light detectable with the detector device (60) is dependent, and

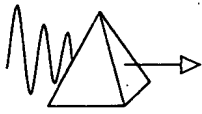
THIS PAGE BLANK (USPTO)

- an image generator (70) for reconstruction of an object image from partial images which were recorded with the detector device (60), characterized in that
 - the illumination device (10) and/or the pattern generator (20, 20', 20'') are set up for the purpose of generating object conditions on which the detectable light is nonlinearly dependent, and
 - the image generator (70) is designed for reconstruction of the object image using the non-linear dependence of the detectable light on the object conditions.
23. Usage of a process or an optical system according to one of the preceding claims in combination with optical microscopy processes, particularly in combination with standard far field microscopy, epifluorescence microscopy, confocal microscopy, 4Pi microscopy, theta microscopy, near field microscopy, microscopic I^2M , I^3M , and I^5M processes, STED processes, multiphoton microscopy, CARS processes, and SHG or THG microscopy.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



v. Bezold & Sozien
Patentanwälte

v. Bezold & Sozien · Akademiestr. 7 · D-80799 München

Europäisches Patentamt
Erhardstraße 27

D-80298 München

Direktion: 2217

Dieter v. Bezold
Dr. rer. nat.

Peter Schütz
Dipl.-Ing.

Wolfgang Heusler
Dipl.-Ing.

Oliver Hertz
Dr. rer. nat., Dipl.-Phys.

Jutta Draudt
Dr. rer. nat., Dipl.-Chem.

Patentanwälte
European Patent and
Trademark Attorneys

Akademiestr. 7
D-80799 München

Tel.: +49-89-38 999 80
Fax: +49-89-38 999 850
eMail: info@sombez.com

17. Januar 2001

Aktenzeichen: PCT/EP00/01806
Anmelder: Max-Planck-Gesellschaft
Unser Zeichen: 15129/PCT Hz/ap

Auf den amtlichen Bescheid vom 20.10.2000

Hiermit werden neue Patentansprüche 1, 14 und 23 eingereicht, die die ursprünglichen Patentansprüche 1, 14 und 23 im weiteren Verfahren ersetzen sollen. Es wird um Fortsetzung des Verfahrens der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der geänderten Unterlagen gebeten.

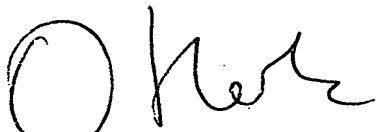
Die Ansprüche wurden wie folgt geändert. Die Ansprüche 1 und 14 wurden gegenüber WO 97/06509 abgegrenzt und entsprechend dem Vorschlag der Prüfungsstelle auf der Grundlage der Beschreibung (Seite 6, Zeilen 16 bis 25) klargestellt. In Anspruch 1 wurde die Formulierung „durch Rekonstruktion der Raumfrequenzanteile“ in Bezug auf die Ermittlung der Objektabbildung aus den Teilbildern gestrichen. Diese Streichung ist aus den folgenden Gründen zulässig. In der ursprünglich eingereichten Fassung der

THIS PAGE BLANK (USPTO)

vorliegenden Patentanmeldung ist allgemein die Rekonstruktion der Objektabbildung aus den Teilbildern (ohne die gestrichene Formulierung) offenbart (siehe z. B. ursprünglicher Anspruch 14). Die Streichung stellt ferner eine Klarstellung der Anspruchsformulierung dar. Die Rekonstruktion der Objektabbildung basiert insbesondere auf der Lösung eines Gleichungssystems auf der Grundlage der aufgenommenen Teilbilder (siehe Beschreibung, Seite 22, letzter Absatz bis Seite 25, Absatz).

In Anspruch 23 wurde der Ausdruck „herkömmliche“ gestrichen. Der Ausdruck „insbesondere“ wurde beibehalten. Die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist nicht auf die in Anspruch 23 beispielhaft aufgeführten Verfahren beschränkt. Die Verwendung von „insbesondere“ ist zulässig. Die Streichung von „insbesondere“ würde die Formulierung eines abhängigen Verwendungsanspruches erfordern.

Nachdem die Unterlagen entsprechend den Hinweisen im Prüfungsbescheid überarbeitet wurden, wird um die Übermittlung eines positiven internationalen vorläufigen Prüfungsberichtes gebeten.



Dr. Oliver Hertz
Patentanwalt

Anlage:

Neue Patentansprüche 1, 14 und 23 (dreifach)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patentansprüche 1, 14 und 23

1. Verfahren zur Gewinnung einer Objektabbildung mindestens eines Objekts (40), wobei mindestens zwei Teilbilder des Objekts (40) unter jeweils verschiedenen Objektbedingungen aufgenommen werden, die am Objekt mit räumlichen Mustern ausgebildet sind, und aus den Teilbildern die gewünschte Objektabbildung ermittelt wird,

dadurch gekennzeichnet, dass

die räumlichen Muster so ausgebildet sind, dass die Teilbilder unterschiedliche Beiträge verschiedener Raumfrequenzanteile der Objektstruktur enthalten und jeweils für einen Objektpunkt eine nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt her detektierten Lichtes von den am Objektpunkt gegebenen Bedingungen besteht, und

die Ermittlung der Objektabbildung unter Ausnutzung der nicht-linearen Abhängigkeit des detektierten Lichtes von den jeweiligen Objektbedingungen erfolgt.

14. Optisches Abbildungssystem (100) mit:

- einer Beleuchtungseinrichtung (10) und einer Detektoreinrichtung (60), die dazu eingerichtet sind, ein Objekt (40) zu beleuchten bzw. eine Abbildung des Objekts (40) oder von Teilen des Objekts (40) aufzunehmen,

- mindestens einem Mustergenerator (20, 20', 20'') zur Erzeugung mindestens eines veränderlichen räumlichen Musters von Objektbedingungen am Objekt (40), wobei die Beleuchtungseinrichtung (10) und/oder der Mustergenerator (20, 20', 20'') dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das mit der Detektoreinrichtung (60) detektierbare Licht abhängig ist, und

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- einem Bildgenerator (70) zur Rekonstruktion einer Objektabbildung aus Teilbildern, die mit der Detektoreinrichtung (60) aufgenommen worden sind,

dadurch gekennzeichnet, dass

- die Beleuchtungseinrichtung (10) und/oder der Mustergenerator (20, 20', 20'') dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das detektierbare Licht nicht-linear abhängig ist, und

- der Bildgenerator (70) zur Rekonstruktion der Objektabbildung unter Verwendung der nicht-linearen Abhängigkeit des detektierbaren Lichtes von den Objektbedingungen ausgelegt ist.

23. Verwendung eines Verfahrens oder eines optischen Systems gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Kombination mit optischen Mikroskopieverfahren, insbesondere in Kombination mit der Standard-Fernfeldmikroskopie, der Epifluoreszenzmikroskopie, der Konfokalmikroskopie, der 4Pi-Mikroskopie, der Theta-Mikroskopie, der Nahfeldmikroskopie, mikroskopischen I^2M -, I^3M - und I^5M -Verfahren, STED-Verfahren, Multiphotonenmikroskopie, CARS-Verfahren und SHG- oder THG-Mikroskopie.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn diese nicht bekannt ist, bei der oder mehreren Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ _____

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15129/PCT ap
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01806	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02.03.2000	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 02.03.1999
Bezeichnung der Erfindung Verfahren und Vorrichtung zur Objektabbildung		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V. Hofgartenstraße 8 D-80539 München (DE)		Telefonnr.: Telefaxnr.: Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Heintzmann, Rainer Stumpfe Eiche 11 D-37077 Göttingen (DE)		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Cremer, Christoph Mombertplatz 23 D-69126 Heidelberg (DE)		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

und ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.

☐ wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.

☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Hertz, Oliver
v. Bezold & Sozien
Akademiestraße 7
D-80799 München (DE)

Telefonnr.:

089 / 3899980

Telefaxnr.:

089 / 38999850

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde*

- i) ☐ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34
- ☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
 - ☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
 - ☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
- berücksichtigt.
- iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

☒ Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (*das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind*) ausgenommen

.....

.....

(*Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.*)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

- | | | |
|---|---|---------|
| 1. Änderungen nach Artikel 34 | : | Blätter |
| Beschreibung | : | Blätter |
| Ansprüche | : | Blätter |
| Zeichnungen | : | Blätter |
| 2. Begleitschreiben zu den Änderungen nach Artikel 34 | : | Blätter |
| 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 5. Sonstige (einzeln aufführen): | : | Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|---|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht | 5. <input type="checkbox"/> sonstige (einzeln aufführen): |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift | |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.


Dr. Oliver Hertz
Patentanwalt

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:

2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b):

3. ☐ Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung. ☐ Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet

4. ☐ Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.

5. ☐ Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT.

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG

Anlage zum Antrag auf internationale vorläufige Prüfung

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung
beauftragten Behörde auszufüllen

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">Internationales Aktenzeichen</td> <td>PCT/EP00/01806</td> </tr> <tr> <td>Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts</td> <td>15129/PCT ap</td> </tr> </table>	Internationales Aktenzeichen	PCT/EP00/01806	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	15129/PCT ap	<div style="border: 1px solid black; height: 100px; width: 100%;"></div>
Internationales Aktenzeichen	PCT/EP00/01806				
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	15129/PCT ap				
Anmelder Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V.					
Berechnung der vorgeschriebenen Gebühren 1. Gebühr für die vorläufige Prüfung EUR 1.533,00 P 2. Bearbeitungsgebühr (Anmelder aus einigen Staaten haben Anspruch auf eine Ermäßigung der Bearbeitungsgebühr um 75%. Hat der Anmelder (oder haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so beträgt der in Feld H einzutragende Betrag 25 % der Bearbeitungsgebühr.) EUR 147,00 H 3. Gesamtbetrag der vorgeschriebenen Gebühren Addieren Sie die Beträge in den Feldern P und H und tragen Sie die Summe in das nebenstehende Feld ein EUR 1.680,00 <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px; text-align: center;">INSGESAMT</div>					
Zahlungsart <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <input type="checkbox"/> Abbuchungsauftrag für das laufende Konto bei der IPEA (siehe unten) <input checked="" type="checkbox"/> Scheck <input type="checkbox"/> Postanweisung <input type="checkbox"/> Bankwechsel </div> <div style="width: 45%;"> <input type="checkbox"/> Barzahlung <input type="checkbox"/> Gebührenmarken <input type="checkbox"/> Kupons <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln angeben): </div> </div>					
Abbuchungsauftrag (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Behörden) Die IPEA/ _____ <input type="checkbox"/> wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto abzubuchen. <input type="checkbox"/> (dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Vorschriften der IPEA über laufende Konten dieses Verfahren erlauben) wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.					
Kontonummer _____	Datum (Tag/Monat/Jahr) _____				
Unterschrift _____					

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) 15129/PCT Ri

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Verfahren und Vorrichtung zur Objektabbildung

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Max-Planck-Gesellschaft
zur Förderung der Wissenschaften e.V.
Hofgartenstraße 8
D-80539 München (DE)

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Heintzmann, Rainer
Stumpfe Eiche 11
D-37077 Göttingen (DE)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Hertz, Oliver
v. Bezold & Sozien
Akademiestraße 7
D-80799 München (DE)

Telefonnr.:

+49-89-3899980

Telefaxnr.:

+49-89-38999850

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Cremer, Christoph
Mombertplatz 23
D-69126 Heidelberg (DE)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☐ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☐ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☐ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRÜCHEWeitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. ☐

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) DE	02.03.1999	199 08 883.7	
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

☐ Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.**Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE**

Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA / _____

Frühere Recherche Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt):

Datum (Tag/Monat/Jahr):

Aktenzeichen:

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfasst:

1. Antrag : 4 Blätter
 2. Beschreibung : 36 Blätter
 3. Ansprüche : 5 Blätter
 4. Zusammenfassung : 1 Blätter
 5. Zeichnungen : 8 Blätter
Insgesamt : 54 Blätter

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☐ Unterzeichnete gesonderte Vollmacht
 2. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht
 3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift
 4. ☐ Prioritätsbeleg(c) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):
 5. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
 6. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen
 7. ☐ Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
 8. ☐ Sonstige (einzeln auflisten):

Abbildung Nr. 2 der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Hertz, Oliver
Europäischer Patentanwalt

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG Anhang zum Antrag

Von Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Aktenzeichen des Anmelders
oder Anwalts 15129/PCT RI

Eingangsstempel des Anmeldeamts

Anmelder
Max-Planck-Gesellschaft ... et al.

BERECHNUNG DER VORGESCHRIEBENEN GEBÜHREN

1. ÜBERMITTLUNGSGEBÜHR EUR 102,00 T

2. RECHERCHENGEBÜHR EUR 945,00 S

Die internationale Recherche ist durchzuführen von
(Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig,
ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll.)

3. INTERNATIONALE GEBÜHR

Grundgebühr

Die internationale Anmeldung enthält 54 Blätter.

umfaßt die ersten 30 Blätter EUR 413,00 b₁

24 x 10,00 = EUR 240,00 b₂

Anzahl der Blätter Zusatzblattgebühr
über 30

Addieren Sie die in Feld b₁ und b₂ eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld B ein EUR 653,00 B

Bestimmungsgebühren

Die internationale Anmeldung enthält 3 Bestimmungen.

3 x EUR 95,00 = EUR 285,00 D

Anzahl der zu zahlenden Bestimmungsgebühr

Bestimmungsgebühren (maximal 11)

Addieren Sie die in Feld B und D eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld I ein
(Anmelder aus einigen Staaten haben Anspruch auf eine Ermäßigung der internationalen Gebühr um
75%. Hat der Anmelder (oder haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so beträgt der in Feld I
einzutragende Gesamtbetrag 25% der Summe der in Feld B und D eingetragenen Beträge.)

EUR 938,00 I

4. GEBÜHR FÜR PRIORITÄTSBELEG P

5. GESAMTBETRAG DER ZU ZAHLENDEN GEBÜHREN

Addieren Sie die in Feldern T, S, I und P eingetragenen Beträge,
und tragen Sie die Summe in das nebenstehende Feld ein

EUR 1.985,00

INSGESAMT

☐ Die Bestimmungsgebühren werden jetzt noch nicht gezahlt.

ZAHLUNGSWEISE

☐ Abbuchungsauftrag (siehe unten) ☐ Bankwechsel ☐ Kupons
☒ Scheck ☐ Barzahlung ☐ Sonstige (einzeln angeben):
☐ Postanweisung ☐ Gebührenmarken

ABBUCHUNGSAUFTRAG (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Anmeldeämtern)

Das Anmeldeamt/ ☐ wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto abzubuchen.
☐ wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.
☐ wird beauftragt, die Gebühr für die Ausstellung des Prioritätsbelegs und seine Übermittlung an das Internationale Büro der WIPO von meinem laufenden Konto abzubuchen.

Kontonummer

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Unterschrift



THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWES

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

Hertz, Oliver
VON BEZOLD & SOZIEN
Akademiestrasse 7
D-80799 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN

28. Feb. 2001

v. Bezold & Sozien

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 27.02.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
15129/PCT Ri

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP00/01806

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
02/03/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
02/03/1999

Anmelder
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ...

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

ANDREATTA, R

Tel. +49 89 2399-7581



THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15129/PCT Ri	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01806	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02/03/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 02/03/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G02B21/00		
Anmelder MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ...		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 23/08/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 27.02.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Narganes-Quijano, F Tel. Nr. +49 89 2399 2348 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-36 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

2-13,15-22 ursprüngliche Fassung

1,14,23 eingegangen am 17/01/2001 mit Schreiben vom 17/01/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/8-8/8 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01806

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Unter den im Recherchenbericht angegebenen Dokumenten sind die folgenden Dokumente in diesem Bescheid genannt:

D1 = WO9706509 A

D2 = WO9711355.A

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Das Dokument D1 wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1 bzw. 14 angesehen. D1 offenbart ein optisches Abbildungssystem (siehe Fig. 1, Seite 1, Zeile 26 - Seite 3, Zeile 27 und Seite 4, Zeile 16 - Seite 5, Zeile 26) mit einer Beleuchtungseinrichtung (Seite 5, Zeilen 3-4) und einer Detektoreinrichtung (Seite 5, Zeilen 2-6), die dazu eingerichtet sind, ein Objekt zu beleuchten bzw. eine Abbildung des Objekts aufzunehmen (Fig. 1). Außerdem enthält das optische Abbildungssystem einen Mustergenerator zur Erzeugung eines veränderlichen räumlichen Musters von Objektbedingungen am Objekt (Seite 5, Zeilen 16-26), wobei die Beleuchtungseinrichtung und der Mustergenerator dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das mit der Detektoreinrichtung detektierbare Licht abhängig ist, und einen Bildgenerator zur Rekonstruktion einer Objektabbildung aus Bildern, die mit der Detektoreinrichtung aufgenommen worden sind (Seite 5, Zeilen 6-15).
- 1.1 Der Gegenstand nach Anspruch 14 unterscheidet sich von diesem Stand der Technik dadurch, daß das mit der Detektoreinrichtung detektierbare Licht von den erzeugten Objektbedingungen nicht-linear abhängig ist.

Optische Abbildungssysteme auf der Basis nicht-linearer optischer Effekte sind in dem Stand der Technik bekannt, siehe z.B. Dokument D2 (Zusammenfassung)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

und Seite 4, Zeilen 18-28 der Beschreibung der vorliegenden Anmeldung. Kein Dokument des Standes der Technik gibt jedoch eine Anregung zur Verwendung nicht-linearer optischer Effekte in Abbildungsverfahren nach Dokument D1, die zu einer erheblichen Erhöhung des räumlichen Auflösungsvermögens führt, siehe Seite 6, Zeilen 3-29 der Beschreibung.

Daher erfüllt Anspruch 14 die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT.

- 1.2 Anspruch 1 bezieht sich auf das entsprechende optische Abbildungsverfahren. Somit erfüllt auch Anspruch 1 die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT.
2. Die abhängigen Ansprüche 2-13 und 15-22 sind auf vorteilhafte Ausgestaltungen des Abbildungsverfahrens nach Anspruch 1 bzw. des Abbildungssystems nach Anspruch 14 gerichtet und erfüllen auch die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT.
3. Anspruch 23 bezieht sich auf die Verwendung des im Anspruch 1 definierten Verfahrens bzw. des im Anspruch 14 definierten optischen Systems in Kombination mit optischen Mikroskopieverfahren bzw. mit den entsprechenden optischen Mikroskopanordnungen. Somit erfüllt auch Anspruch 1 die Erfordernisse des Artikels 33(1) PCT.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.
3. Die auf Seite 36, Zeilen 8-12 der Beschreibung spezifizierten Ausgestaltungen, die sich auf "beliebige Kombinationen" von Merkmalen basieren, sind nicht klar.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Eine solche Unklarheit läßt Zweifel über den Schutzbereich entstehen und damit die Klarheit der Patentansprüche beeinträchtigen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Aktenzeichen: PCT/EP00/01806
Anmelder: Max-Planck-Gesellschaft

15129/PCT Hz/ap
17.01.2001

Patentansprüche 1, 14 und 23

1. Verfahren zur Gewinnung einer Objektabbildung mindestens eines Objekts (40), wobei mindestens zwei Teilbilder des Objekts (40) unter jeweils verschiedenen Objektbedingungen aufgenommen werden, die am Objekt mit räumlichen Mustern ausgebildet sind, und aus den Teilbildern die gewünschte Objektabbildung ermittelt wird,

dadurch gekennzeichnet, dass

die räumlichen Muster so ausgebildet sind, dass die Teilbilder unterschiedliche Beiträge verschiedener Raumfrequenzanteile der Objektstruktur enthalten und jeweils für einen Objektpunkt eine nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt her detektierten Lichtes von den am Objektpunkt gegebenen Bedingungen besteht, und

die Ermittlung der Objektabbildung unter Ausnutzung der nicht-linearen Abhängigkeit des detektierten Lichtes von den jeweiligen Objektbedingungen erfolgt.

14. Optisches Abbildungssystem (100) mit:

- einer Beleuchtungseinrichtung (10) und einer Detektoreinrichtung (60), die dazu eingerichtet sind, ein Objekt (40) zu beleuchten bzw. eine Abbildung des Objekts (40) oder von Teilen des Objekts (40) aufzunehmen,
- mindestens einem Mustergenerator (20, 20', 20'') zur Erzeugung mindestens eines veränderlichen räumlichen Musters von Objektbedingungen am Objekt (40), wobei die Beleuchtungseinrichtung (10) und/oder der Mustergenerator (20, 20', 20'') dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das mit der Detektoreinrichtung (60) detektierbare Licht abhängig ist, und

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- einem Bildgenerator (70) zur Rekonstruktion einer Objektabbildung aus Teilbildern, die mit der Detektoreinrichtung (60) aufgenommen worden sind,

dadurch gekennzeichnet, dass

- die Beleuchtungseinrichtung (10) und/oder der Mustergenerator (20, 20', 20'') dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das detektierbare Licht nicht-linear abhängig ist, und

- der Bildgenerator (70) zur Rekonstruktion der Objektabbildung unter Verwendung der nicht-linearen Abhängigkeit des detektierbaren Lichtes von den Objektbedingungen ausgelegt ist.

23. Verwendung eines Verfahrens oder eines optischen Systems gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Kombination mit optischen Mikroskopieverfahren, insbesondere in Kombination mit der Standard-Fernfeldmikroskopie, der Epifluoreszenzmikroskopie, der Konfokalmikroskopie, der 4Pi-Mikroskopie, der Theta-Mikroskopie, der Nahfeldmikroskopie, mikroskopischen I^2M -, I^3M - und I^5M -Verfahren, STED-Verfahren, Multiphotonenmikroskopie, CARS-Verfahren und SHG- oder THG-Mikroskopie.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15129/PCT Ri	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 01806	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02/03/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 02/03/1999
Anmelder MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT . . .		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 3

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☒ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld III

WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Zeile 12 neu:

Systeme (100) zur Umsetzung eines derartigen Verfahrens beschrieben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G02B21/00 G01N21/17 G01N21/62 G06T7/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G02B G01N G06T

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 06509 A (GIM SYSTEMS LTD ;FRIEDMAN MARK M (IL); BEN LEVY MEIR (IL); PELEC E) 20. Februar 1997 (1997-02-20) Seite 1, Zeile 3 -Seite 24, Zeile 14 Zusammenfassung; Abbildungen 1,2,4 ---	1,7-9, 13-17, 20-23
A	WO 97 11355 A (CORNELL RES FOUNDATION INC ;WEBB WATT W (US); XU CHRIS (US)) 27. März 1997 (1997-03-27) Seite 1, Zeile 3 -Seite 4, Zeile 8 Seite 8, Zeile 8 -Seite 9, Zeile 34 Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	1,5,14, 23
A	DE 43 26 473 A (EUROP MOLECULAR BIOLOGY LAB) 9. Februar 1995 (1995-02-09) Spalte 3, Zeile 13 - Zeile 42 Spalte 5, Zeile 22 - Zeile 51 Zusammenfassung; Abbildung 3 ---	14,18, 21-23
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Juli 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Narganes-Quijano, F

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 929 951 A (SMALL JAMES G) 29. Mai 1990 (1990-05-29) Spalte 6, Zeile 50 -Spalte 7, Zeile 60 Zusammenfassung; Abbildung 3 ---	1,7-9, 14,20-23
A	DUNCAN M D: "MOLECULAR DISCRIMINATION AND CONTRAST ENHANCEMENT USING A SCANNING COHERENT ANTI-STOKES RAMAN MICROSCOPE" OPTICS COMMUNICATIONS,NL,NORTH-HOLLAND PUBLISHING CO. AMSTERDAM, Bd. 50, Nr. 5, 1. Juli 1984 (1984-07-01), Seiten 307-312, XP000707803 ISSN: 0030-4018 Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	5,23
A	HELL S ET AL: "PROPERTIES OF A 4PI CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPE" JOURNAL OF THE OPTICAL SOCIETY OF AMERICA - A,US,OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, WASHINGTON, Bd. 9, Nr. 12, 1. Dezember 1992 (1992-12-01), Seiten 2159-2166, XP000328467 ISSN: 0740-3232 Zusammenfassung; Abbildung 11 -----	18,23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

/EP 00/01806

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9706509 A	20-02-1997	US 5867604 A AU 6680296 A EP 0842497 A	02-02-1999 05-03-1997 20-05-1998
WO 9711355 A	27-03-1997	AU 700560 B AU 6972496 A CA 2231222 A EP 0852716 A JP 10512959 T NO 981032 A NZ 318277 A	07-01-1999 09-04-1997 27-03-1997 15-07-1998 08-12-1998 04-05-1998 25-02-1999
DE 4326473 A	09-02-1995	DE 9321413 U	20-11-1997
US 4929951 A	29-05-1990	KEINE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No

PCT/EP 00/01806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G02B21/00 G01N21/17 G01N21/62 G06T7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G02B G01N G06T

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 06509 A (GIM SYSTEMS LTD ;FRIEDMAN MARK M (IL); BEN LEVY MEIR (IL); PELEC E) 20 February 1997 (1997-02-20) page 1, line 3 -page 24, line 14 abstract; figures 1,2,4	1,7-9, 13-17, 20-23
A	WO 97 11355 A (CORNELL RES FOUNDATION INC ;WEBB WATT W (US); XU CHRIS (US)) 27 March 1997 (1997-03-27) page 1, line 3 -page 4, line 8 page 8, line 8 -page 9, line 34 abstract; figure 1	1,5,14, 23
A	DE 43 26 473 A (EUROP MOLECULAR BIOLOGY LAB) 9 February 1995 (1995-02-09) column 3, line 13 - line 42 column 5, line 22 - line 51 abstract; figure 3	14,18, 21-23

-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 July 2000

Date of mailing of the international search report

10/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Narganes-Quijano, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01806

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 929 951 A (SMALL JAMES G) 29 May 1990 (1990-05-29) column 6, line 50 -column 7, line 60 abstract; figure 3	1,7-9, 14,20-23
A	DUNCAN M D: "MOLECULAR DISCRIMINATION AND CONTRAST ENHANCEMENT USING A SCANNING COHERENT ANTI-STOKES RAMAN MICROSCOPE" OPTICS COMMUNICATIONS,NL,NORTH-HOLLAND PUBLISHING CO. AMSTERDAM, vol. 50, no. 5, 1 July 1984 (1984-07-01), pages 307-312, XP000707803 ISSN: 0030-4018 abstract; figure 1	5,23
A	HELL S ET AL: "PROPERTIES OF A 4PI CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPE" JOURNAL OF THE OPTICAL SOCIETY OF AMERICA - A,US,OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, WASHINGTON, vol. 9, no. 12, 1 December 1992 (1992-12-01), pages 2159-2166, XP000328467 ISSN: 0740-3232 abstract; figure 11	18,23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. International Application No

PCT/EP 00/01806

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9706509 A	20-02-1997	US 5867604 A AU 6680296 A EP 0842497 A	02-02-1999 05-03-1997 20-05-1998
WO 9711355 A	27-03-1997	AU 700560 B AU 6972496 A CA 2231222 A EP 0852716 A JP 10512959 T NO 981032 A NZ 318277 A	07-01-1999 09-04-1997 27-03-1997 15-07-1998 08-12-1998 04-05-1998 25-02-1999
DE 4326473 A	09-02-1995	DE 9321413 U	20-11-1997
US 4929951 A	29-05-1990	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01806

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G02B21/00 G01N21/17 G01N21/62 G06T7/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G02B G01N G06T

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 06509 A (GIM SYSTEMS LTD ;FRIEDMAN MARK M (IL); BEN LEVY MEIR (IL); PELEC E) 20. Februar 1997 (1997-02-20) Seite 1, Zeile 3 -Seite 24, Zeile 14 Zusammenfassung; Abbildungen 1,2,4	1,7-9, 13-17, 20-23
A	WO 97 11355 A (CORNELL RES FOUNDATION INC ;WEBB WATT W (US); XU CHRIS (US)) 27. März 1997 (1997-03-27) Seite 1, Zeile 3 -Seite 4, Zeile 8 Seite 8, Zeile 8 -Seite 9, Zeile 34 Zusammenfassung; Abbildung 1	1,5,14, 23
A	DE 43 26 473 A (EUROP MOLECULAR BIOLOGY LAB) 9. Februar 1995 (1995-02-09) Spalte 3, Zeile 13 - Zeile 42 Spalte 5, Zeile 22 - Zeile 51 Zusammenfassung; Abbildung 3	14,18, 21-23
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10/07/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Narganes-Quijano, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 929 951 A (SMALL JAMES G) 29. Mai 1990 (1990-05-29) Spalte 6, Zeile 50 -Spalte 7, Zeile 60 Zusammenfassung; Abbildung 3	1,7-9, 14,20-23
A	DUNCAN M D: "MOLECULAR DISCRIMINATION AND CONTRAST ENHANCEMENT USING A SCANNING COHERENT ANTI-STOKES RAMAN MICROSCOPE" OPTICS COMMUNICATIONS,NL,NORTH-HOLLAND PUBLISHING CO. AMSTERDAM, Bd. 50, Nr. 5, 1. Juli 1984 (1984-07-01), Seiten 307-312, XP000707803 ISSN: 0030-4018 Zusammenfassung; Abbildung 1	5,23
A	HELL S ET AL: "PROPERTIES OF A 4PI CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPE" JOURNAL OF THE OPTICAL SOCIETY OF AMERICA - A,US,OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, WASHINGTON, Bd. 9, Nr. 12, 1. Dezember 1992 (1992-12-01), Seiten 2159-2166, XP000328467 ISSN: 0740-3232 Zusammenfassung; Abbildung 11	18,23

INTERNATIONALER RECHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01806

Im Recherchebericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(r) der Patentfamili	Datum der Veröffentlichung
WO 9706509 A	20-02-1997	US 5867604 A AU 6680296 A EP 0842497 A	02-02-1999 05-03-1997 20-05-1998
WO 9711355 A	27-03-1997	AU 700560 B AU 6972496 A CA 2231222 A EP 0852716 A JP 10512959 T NO 981032 A NZ 318277 A	07-01-1999 09-04-1997 27-03-1997 15-07-1998 08-12-1998 04-05-1998 25-02-1999
DE 4326473 A	09-02-1995	DE 9321413 U	20-11-1997
US 4929951 A	29-05-1990	KEINE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15129/PCT Ri	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 01806	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02/03/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 02/03/1999
Anmelder MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ...		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprach durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die international Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitslichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts in Stellungnahme vorlegen.

6. Folgend Abbildung der Zeichnung ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 3

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☒ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld III**WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)**

Zeile 12 neu:
Systeme (100) zur Umsetzung eines derartigen Verfahrens beschrieben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G02B21/00 G01N21/17 G01N21/62 G06T7/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G02B G01N G06T

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 06509 A (GIM SYSTEMS LTD ;FRIEDMAN MARK M (IL); BEN LEVY MEIR (IL); PELEC E) 20. Februar 1997 (1997-02-20) Seite 1, Zeile 3 -Seite 24, Zeile 14 Zusammenfassung; Abbildungen 1,2,4 ---	1,7-9, 13-17, 20-23
A	WO 97 11355 A (CORNELL RES FOUNDATION INC ;WEBB WATT W (US); XU CHRIS (US)) 27. März 1997 (1997-03-27) Seite 1, Zeile 3 -Seite 4, Zeile 8 Seite 8, Zeile 8 -Seite 9, Zeile 34 Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	1,5,14, 23
A	DE 43 26 473 A (EUROP MOLECULAR BIOLOGY LAB) 9. Februar 1995 (1995-02-09) Spalte 3, Zeile 13 - Zeile 42 Spalte 5, Zeile 22 - Zeile 51 Zusammenfassung; Abbildung 3 ---	14,18, 21-23

	---/---	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Juli 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Narganes-Quijano, F

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 929 951 A (SMALL JAMES G) 29. Mai 1990 (1990-05-29) Spalte 6, Zeile 50 -Spalte 7, Zeile 60 Zusammenfassung; Abbildung 3 ---	1,7-9, 14,20-23
A	DUNCAN M D: "MOLECULAR DISCRIMINATION AND CONTRAST ENHANCEMENT USING A SCANNING COHERENT ANTI-STOKES RAMAN MICROSCOPE" OPTICS COMMUNICATIONS,NL,NORTH-HOLLAND PUBLISHING CO. AMSTERDAM, Bd. 50, Nr. 5, 1. Juli 1984 (1984-07-01), Seiten 307-312, XP000707803 ISSN: 0030-4018 Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	5,23
A	HELL S ET AL: "PROPERTIES OF A 4PI CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPE" JOURNAL OF THE OPTICAL SOCIETY OF AMERICA - A,US,OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, WASHINGTON, Bd. 9, Nr. 12, 1. Dezember 1992 (1992-12-01), Seiten 2159-2166, XP000328467 ISSN: 0740-3232 Zusammenfassung; Abbildung 11 -----	18,23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/01806

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9706509	A	20-02-1997	US 5867604 A AU 6680296 A EP 0842497 A	02-02-1999 05-03-1997 20-05-1998
WO 9711355	A	27-03-1997	AU 700560 B AU 6972496 A CA 2231222 A EP 0852716 A JP 10512959 T NO 981032 A NZ 318277 A	07-01-1999 09-04-1997 27-03-1997 15-07-1998 08-12-1998 04-05-1998 25-02-1999
DE 4326473	A	09-02-1995	DE 9321413 U	20-11-1997
US 4929951	A	29-05-1990	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

XP-000707803

MOLECULAR DISCRIMINATION AND CONTRAST ENHANCEMENT
USING A SCANNING COHERENT ANTI-STOKES RAMAN MICROSCOPE

M.D. DUNCAN

Laser Physics Branch, Code 6540, Optical Sciences Division, Naval Research Laboratory,
Washington, DC 20375, USA

Received 12 March 1984

Revised manuscript received 17 April 1984

PD 07/1984
307-312
6

1-10153/30

New applications of a nonlinear optical microscope using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) are presented. Excellent molecular discrimination using chemically similar molecular species and signal contrast enhancement using digital image processing are demonstrated. Limitations of the technique and future applications are discussed.

1. Introduction

Few techniques currently available allow the spatial distribution of naturally occurring molecular species in a biological sample to be observed on a microscopic scale ($1\text{ }\mu\text{m}$ or less). Excellent discrimination among distinct chemical species can be obtained by using infrared radiation tuned to the characteristic vibrational frequency of a certain molecule or molecular group, but the spatial resolution is limited by the wavelength of the infrared light. Better spatial resolution can be obtained by using stains or fluorescing agents illuminated by visible or ultraviolet light, but these techniques are limited to certain materials, require elaborate preparation, and introduce foreign agents into the sample. Spontaneous Raman scattering overcomes some of these limitations but is usually used to probe only single locations within a microscopic sample due to overheating of the sample, low signal levels, and difficulties in imaging through a spectrometer [1-3].

The scanning CARS microscope provides a method for overcoming all of the above limitations [4,5]. Molecular discrimination is achieved by using Raman scattering from characteristic molecular vibrations and high spatial resolution is obtained by imaging the visible anti-Stokes signal. Thermal damage to biological samples is avoided by using relatively low average

laser power. Signal is maximized by using picosecond pulses with moderately high peak powers, a condition which takes advantage of the nonlinear dependence of the CARS signal on the peak laser power. Fluorescence is avoided since the anti-Stokes signal light is at a shorter wavelength than any input light and can be isolated with spectral filters. No spectrometer is needed since the anti-Stokes signal is well defined spatially and spectrally. No modification of the sample is required.

In this paper we describe some recent experimental results which demonstrate the utility of the CARS microscope. CARS images of deuterated and non-deuterated liposomes are presented which show high spatial resolution and excellent molecular discrimination. Contrast enhancement and background subtraction are demonstrated using digital image processing techniques. The combination of high spatial resolution, excellent molecular discrimination and digital processing of images provide the CARS microscope with capabilities not found in any other current image technique.

2. Technique

The basic properties of the CARS process are discussed in review papers by Tolles et al. [6] and by

Druet and Taran [7]. The CARS microscope operates by scanning the sample region of interest with two focused laser beams. Focused laser beams are used to increase the signal produced by the non-linear CARS interaction and scanning is used to increase the field of view of the instrument. The laser frequencies are tuned so that their difference matches that of a Raman active vibrational mode in a specific species of interest. When the CARS signal light is then collected, spectrally isolated and imaged, those regions which contain the species of interest produce bright areas on a dark background. This produces a spatial map of the molecular species within a microscopic region without physically modifying the sample in any way.

The CARS microscope is capable of identifying a number of different molecules and molecular groups. Currently the apparatus is designed to tune within the 2000 cm^{-1} to 2700 cm^{-1} range and can therefore be used to identify a large number of deuterated molecules of interest. This region was chosen because of the lack of interference with naturally occurring C—H and O—H Raman bands that abound in biological samples. Samples can be prepared with one molecular component deuterated and then that component can be imaged with minimal interference.

The spatial resolution of the CARS microscope is determined entirely by the wavelength of the signal light and the quality of the collection optics and does not depend on the focal spot sizes of the input laser beams. At present, standard microscope optics combined with simple dichroic spectral filters are used to collect and isolate the signal light. The present CARS microscope system has a spatial resolution of approximately $0.7\text{ }\mu\text{m}$. This could theoretically be improved to $0.25\text{ }\mu\text{m}$.

3. Experimental apparatus

The experimental apparatus is shown schematically in fig. 1. The two laser wavelengths for the CARS process are produced by two cw mode locked dye lasers pumped by a cw mode locked argon-ion laser. One dye laser is operated at 570 nm (rhodamine 6G) and the other dye laser is tuned between 620 nm and 680 nm (DCM) depending on the species of interest. Both dye lasers operate at the 150 mW average power

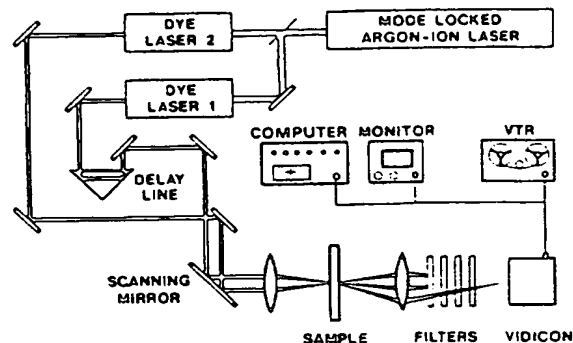


Fig. 1. Schematic diagram of the CARS microscope apparatus. A conventional microscope is used to collect light emerging from the sample and is represented by a single lens to the right of the sample. Beam separation and focusing angles are exaggerated for clarity.

level and 300 W peak power level with pulses of 6 ps to 8 ps duration. The two laser beams are overlapped in time and are then focused onto the sample. The focal spots overlap completely on the sample and are approximately $10\text{ }\mu\text{m}$ in diameter. Scanning of the laser beams across the sample is achieved by tilting the final turning mirror in two orthogonal directions with piezoelectric stacks. Scan dimensions of 30 to $100\text{ }\mu\text{m}$ are easily obtained.

After interaction in the sample, both input laser beams are blocked with short-wavelength-pass dichroic filters. The anti-Stokes signal is passed and focused onto an image intensifier with a gain of $10\,000$. The anti-Stokes image is then transferred onto the cathode of a low-light-level vidicon and digitized using commercial image processing equipment. The CARS images can be viewed in real time or integrated digitally. Raw data and integrated images can be stored on video tape and integrated images can be stored digitally for later processing. Typically images are digitized with a spatial resolution of 512×512 pixels and with 256 gray levels. Integration of up to 256 video frames can be used to increase the signal-to-noise of the incoming images. Subtraction of two images in real time is possible, but typically the apparatus is operated so that 256 video frames of data are integrated and then 256 frames of background signal are subtracted.

4. Experimental results

Early data taken with the CARS microscope showed significant amounts of CARS non-resonant background signal and produced images which were very limited in contrast [4]. In addition, the images reproduced sample morphology. Both processes obscured information concerning the distribution of the material of interest and degraded the signal-to-noise ratio of the images. In some cases the CARS non-resonant background signal accounted for 75% of the signal light produced by the sample. Standard techniques of

background suppression, such as polarization CARS, provide no advantage due to the multi-component nature of the sample (usually layers of different materials within the depth of field of the focused laser beams) and provide no suppression of sample morphology. A solution to both of the above problems is to apply simple image processing techniques to the acquired images. If two images can be taken of the sample region, one with the input lasers tuned on-resonance with the species of interest and another with the lasers tuned slightly off-resonance, and then subtracted digitally, all of the CARS non-resonant

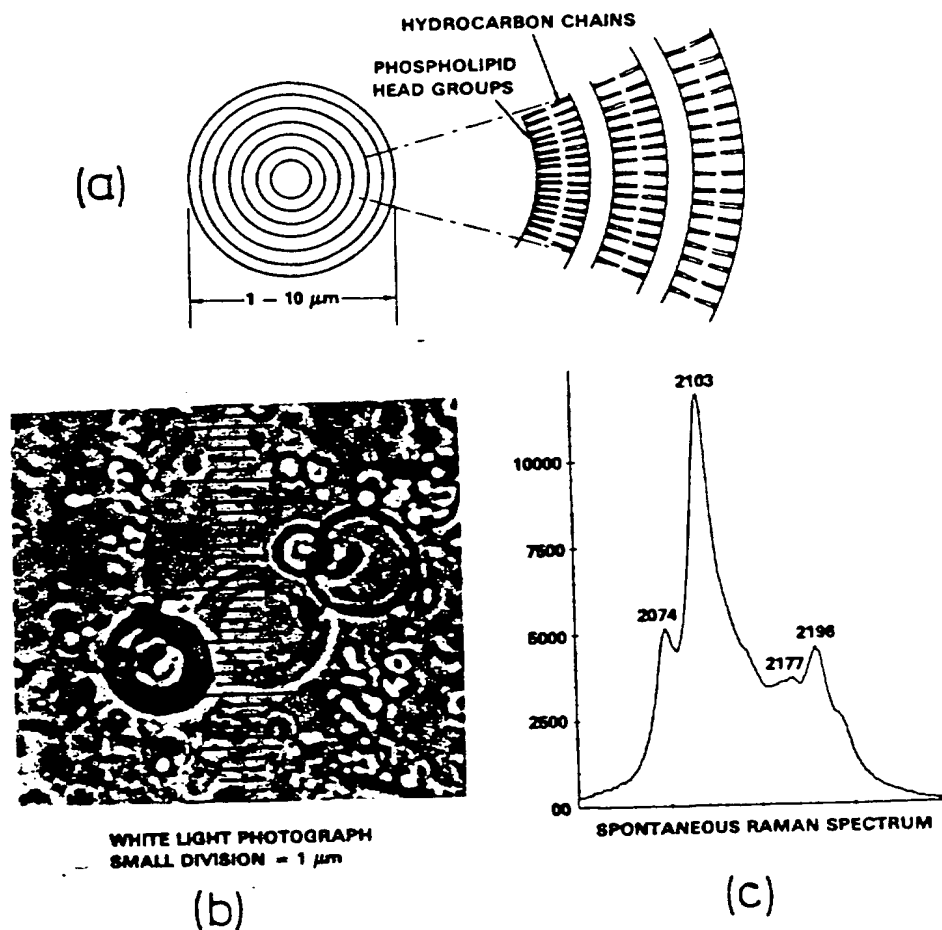


Fig. 2. (a) A schematic representation of a liposome. (b) White light photograph of liposomes. (c) The spontaneous Raman spectrum of deuterated liposomes.

background signal and all features of the sample which are morphologically constant will have been eliminated. The contrast of the final image can be enhanced digitally and it will show an unobscured spatial map of the species of interest. The only assumption which needs to be made is that the CARS non-resonant background signal remains constant as the interaction frequency is changed from resonant with the sample to non-resonant. This is a valid assumption for most molecular species if the tuning is small.

Digital processing of CARS microscope images have been carried out with great success using deuterated and nondeuterated liposomes. Liposomes are microscopic organic structures which have importance in the study of artificial encapsulation of such materi-

als as hemoglobin [8]. Fig. 2a shows a schematic representation of their structure and illustrates the bilayers which form and mimic natural cell walls. Fig. 2b is a white light photomicrograph showing the typical range of sizes and of wall thicknesses of liposomes. Fig. 2c reproduces the spontaneous Raman spectrum of liposomes which have had 50% of their C-H bonds deuterated. Samples of both deuterated and nondeuterated liposomes were obtained and studied using the CARS microscope.

CARS images from both deuterated and non-deuterated liposomes obtained with the digital imaging system are shown in fig. 3. The input lasers were tuned so that the 2100 cm^{-1} C-D bond of the deuterated material was in resonance. Fig. 3a shows a re-

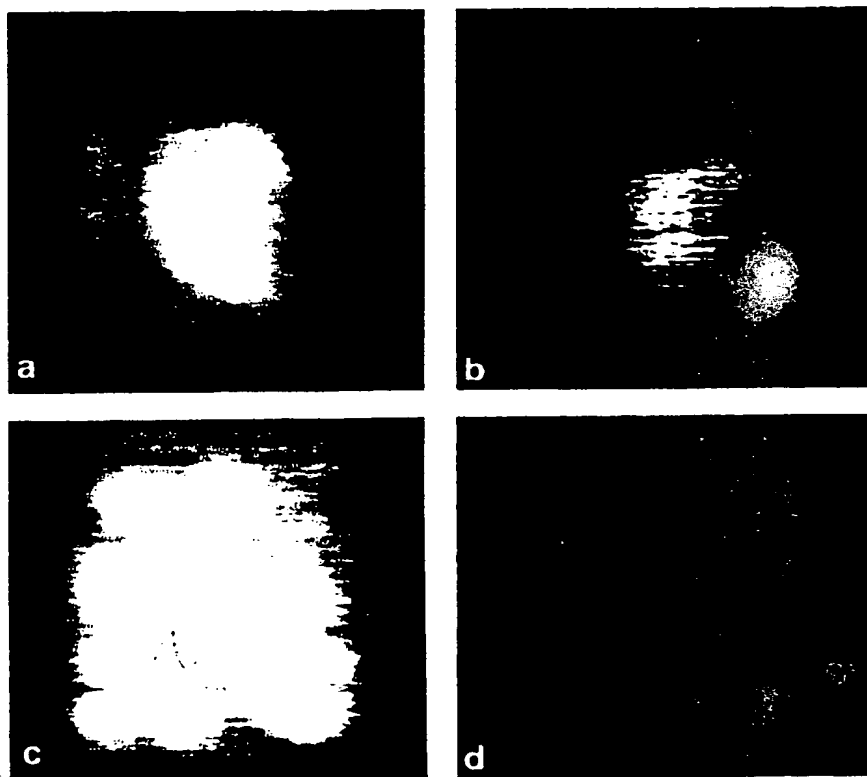


Fig. 3. (a) Unprocessed CARS image of a deuterated liposome taken with lasers tuned to the 2100 cm^{-1} band of the C-D vibration. (b) Processed image with all CARS non-resonant background signal subtracted. (c) Unprocessed CARS image of a non-deuterated liposome, again tuned to the 2100 cm^{-1} band. (d) Image processed as in (b) showing complete suppression of background signal.

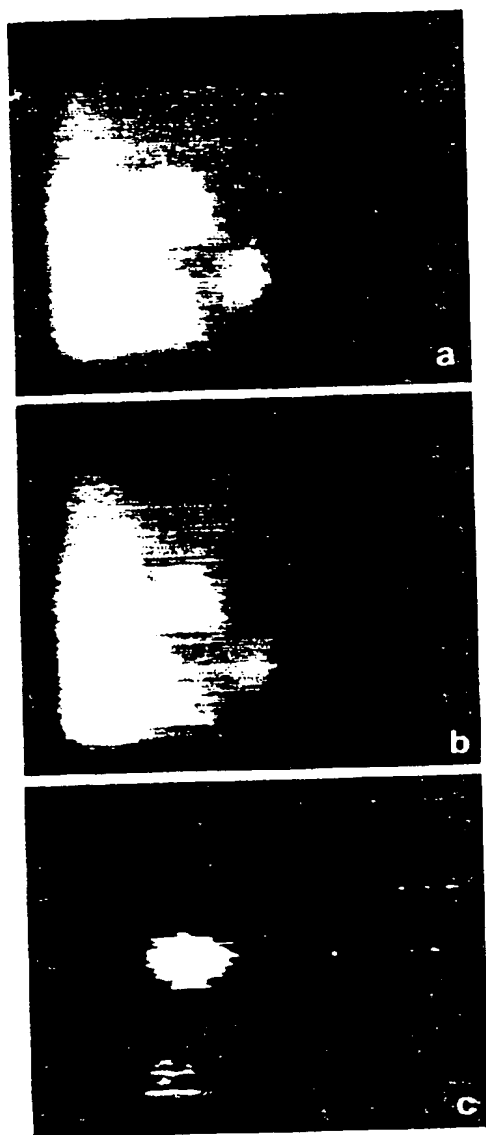


Fig. 4. (a) CARS image of both a deuterated and nondeuterated liposomes with lasers tuned to the 2100 cm^{-1} band of the C-D vibration. (b) Same as (a) but with lasers tuned to 2150 cm^{-1} . (c) Processed image showing regions containing deuterated material. Image noise has been enhanced to illustrate the complete suppression of signal from regions containing nondeuterated material.

gion containing a deuterated liposome and fig. 3c shows a region containing a nondeuterated liposome. Equivalent images were taken of the samples with the input lasers tuned slightly off-resonance and then the off-resonant images were digitally subtracted from the on-resonant ones. The subtracted images were contrast enhanced and are reproduced in fig. 3b and fig. 3d. As is seen in fig. 3b, the CARS non-resonant background signal has been completely suppressed, leaving a spatial map of only the deuterated material within the sample region. Fig. 3d illustrates how completely the morphology and non-resonant background signal are suppressed in the case of a sample of non-deuterated material.

Fig. 4 is another example of data obtained from deuterated and nondeuterated liposomes by the CARS microscope. For this sample, both deuterated and nondeuterated liposomes were mixed together. Fig. 4a is an on-resonance CARS image with two small liposomes within the scan area. Fig. 4b is an image of the same region with the lasers tuned off-resonance, and fig. 4c is the enhanced, digitally subtracted image. It is clearly seen that only one of the originally visible liposomes contains deuterated material. Enhancements to the final image have been made so that the lowest levels of the digital signal have been made visible, causing noise lines to appear in fig. 4c. An unexpected result of this enhancement is seen in the lower left hand side of fig. 4c. There, another, smaller deuterated liposome appears at approximately 15% of the signal level of the larger deuterated liposome. The smaller liposome was not visible in either white light or unprocessed CARS images of the region. Fig. 4 illustrates extremely well the power of the CARS microscope to image a material of interest with high spatial resolution. Using the scale provided with fig. 4 it can be seen that features as small or smaller than one micrometer can be resolved. An infrared microscope could provide equivalent molecular discrimination but would be limited to 5 or $10\text{ }\mu\text{m}$ spatial resolution. Staining or fluorescing techniques have equivalent spatial resolution but could never provide the molecular discrimination needed to distinguish a deuterated from a nondeuterated species.

5. Summary

In conclusion, we have presented data which illustrate some of the unique capabilities of the CARS microscope. Images taken of deuterated and non-deuterated liposomes have verified that the spatial resolution of the CARS microscope is at present better than one micrometer, greater than that of an infrared microscope. Digital image processing has been used to increase the signal-to-noise ratio of CARS microscope images by subtracting out CARS non-resonant background signal and by eliminating constant morphological features of the sample. In addition, digital processing has allowed the detection of material within a microscopic sample region which is invisible under white light illumination. At present, the minimum concentration of a species of interest within a sample that the CARS microscope can detect is approximately 3%.

Future plans for the CARS microscope include studies of the distribution of water within biological cells. Both static and dynamic processes can be studied with living samples.

Acknowledgement

The author would like to take this opportunity to thank J. Reintjes and T.J. Manuccia for valuable technical discussions and E.L. Chang, P. Yeager, and J.P. Sheridan for providing samples of deuterated and non-deuterated liposomes for this study.

This work was supported by the Office of Naval Research.

References

- [1] J.L. Abraham and E.S. Etz, *Science* 206 (1979) 716.
- [2] E.S. Etz, in: *Scanning electron microscopy/1979/1* (III Research Institute, Chicago, Ill., 1979) p. 67.
- [3] P. Dhamelincourt and P. Bisson, *Microsc. Acta* 79 (1977) 267.
- [4] M.D. Duncan, J. Reintjes and T.J. Manuccia, *Optics. Lett.* 7 (1983) 350.
- [5] J. Reintjes, M.D. Duncan and T.J. Manuccia, *Picosecond lasers and applications*, Vol. 322, ed. L.S. Goldberg (SPIE, Bellingham, Washington, 1982) p. 87.
- [6] W.M. Tolles, J.W. Nibler, J.R. McDonald and A.B. Harvey, *Appl. Spectrosc.*, Mar./Apr. (1977).
- [7] S. Druet and J.P. Taran, in: *Chemical and biochemical applications of lasers*, Vol. 4, ed. C. Bradley Moore (Academic Press, New York, 1978) p. 187.
- [8] B.P. Gaber, P. Yeager, J.P. Shearidan and E.L. Chang, *FEBS Lett.* 153 (1983) 285.



XP 000328467

S. Hell and E. H. K. Stelzer

736a Journal of the Optical Society
of America A
9(1992)December, No.12, Washington, DC, US

A 2159

p. 2159-2166

Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope

Stefan Hell and Ernst H. K. Stelzer

Light Microscopy Group, European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D-6900 Heidelberg, Germany

Received April 15, 1992; accepted June 10, 1992; revised manuscript received June 29, 1992

In a 4Pi confocal fluorescence microscope two opposing microscope objective lenses were used to illuminate a fluorescent object from both sides and to collect the fluorescence emissions on both sides. Constructive interference of either the illumination wave fronts in the common focus or the detection wave fronts in the common detector pinhole resulted in an axial resolution approximately four times higher than that in a confocal fluorescence microscope. A precise 4Pi confocal fluorescence microscope that uses simultaneous illumination was built. The full width at half-maximum of the depth discrimination was determined experimentally to be approximately 110 nm when lenses with a numerical aperture of 1.4, an excitation of 633 nm, and detection of approximately 725 nm were used.

INTRODUCTION

The resolution of a confocal fluorescence microscope is determined by the extent of the confocal three-dimensional point-spread function.¹ For pointlike illumination and detection, the volume of the point-spread function depends on the numerical aperture of the microscope objective and on the wavelengths of the emission and the excitation light.^{1,2} The smaller this volume, the better the resolution of the microscope. In the usual confocal and conventional epifluorescence arrangement, the object is illuminated and observed from one side (Fig. 1). The objective lens transforms the illumination wave front into a segment of a spherical wave front. For technical reasons, the maximum aperture of an oil immersion lens is 1.4, i.e., the aperture angle is below $2 \times 68^\circ = 136^\circ$.^{3,4} This fact leads to a geometry for the point-spread-function volume that is extended along the optical axis. If the illumination is uniformly spherical, the resultant spot becomes round and has a diameter somewhat larger than $\lambda/2$. If this ideal illumination is approached and if two microscope objectives of high numerical aperture are used, a fluorescent sample can be illuminated coherently from both sides, and the fluorescence emission is also detected on both sides. This arrangement is equivalent to an increase of the aperture along the axial direction. The result is a point-spread function with a geometry that is determined by the pattern of two wave fronts interfering in a common focal volume. In the case of constructive interference, the axial extent of the confocal point-spread function is reduced; this reduction is equivalent to an improved axial resolution.⁵⁻⁷ A technique that relies on this principle has been described in Ref. 5. A related approach to reflection microscopy, in which a double-pass confocal microscope is used, has been independently described and demonstrated elsewhere.⁸

THEORY

In a confocal fluorescence microscope, a point light source and a point detector are used to observe a fluorescently labeled specimen.⁹⁻¹¹ As a result of diffraction, the illuminating wave front forms a three-dimensional intensity

distribution in the vicinity of the focal spot. This phenomenon is described physically by the point-spread function of the microscope objective lens.¹²

For high numerical apertures, a theory that takes the electromagnetic properties of light into account must be used.^{13,14} According to Richards and Wolf,¹⁵⁻¹⁷ the normalized electric field of linearly polarized light in the focal region of an aplanatic system can be quantified as

$$\mathbf{E} = (e_x, e_y, e_z), \quad (1a)$$

with

$$\begin{aligned} e_x(\mathbf{r}) &= -i(I_0 + I_2 \cos 2\phi), \\ e_y(\mathbf{r}) &= -iI_2 \sin 2\phi, \\ e_z(\mathbf{r}) &= -2I_1 \cos \phi. \end{aligned} \quad (1b)$$

ϕ defines the azimuth angle between the initial direction of vibration of the incident field and the direction of observation; \mathbf{r} is the coordinate originating in the geometrical focus; and I_0 , I_1 , and I_2 are integrals (defined in Ref. 16) over the objective lens aperture, depending on the aperture angle and the wavelength, with I_1 and I_2 vanishing for low numerical apertures.

Equations (1) suggest that, for high numerical apertures and illumination with linearly polarized light, the electric field is not cylindrically symmetric around the optical axis. For $\phi = \pi/2$ (corresponding to the direction perpendicular to the direction of vibration of the incident electric field), the point-spread function is narrower than for $\phi = 0$.¹⁶ Hence the time-averaged illumination-intensity distribution in the focal region for linearly polarized illumination is given by¹⁸

$$\begin{aligned} I &= h_{\text{ill}} = |\mathbf{E}|^2 \\ &= |I_0|^2 + 4|I_1|^2 \cos^2 \phi + |I_2|^2 + 2 \cos 2\phi \operatorname{Re}(I_0 I_2^*). \end{aligned} \quad (2)$$

Equation (2) is also referred to as the illumination point-spread function of the confocal microscope. Figure 2 shows the normalized illumination-intensity distribution along the optical axis for $\phi = \pi/2$, N.A. = 1.4 (oil), and an excitation wavelength of 633 nm.

In the calculation of the detection point-spread function it is assumed that the fluorescent light is randomly

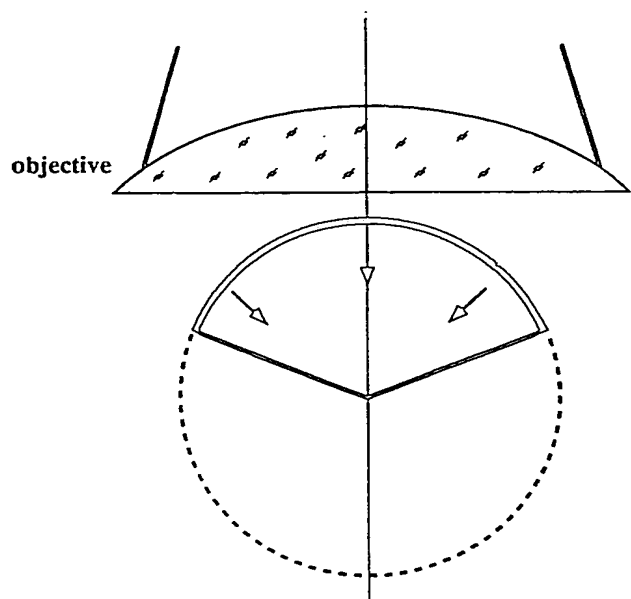


Fig. 1. Aperture angle in microscopy. In the usual epifluorescence arrangement, always less than half of 4π is used to illuminate the point of interest and to detect the emitted light.

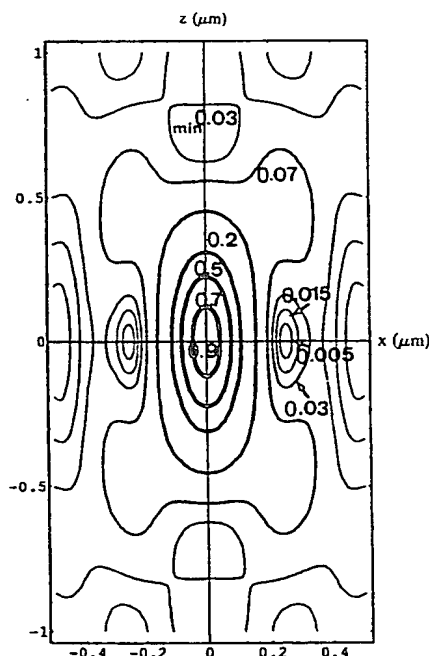


Fig. 2. Contour plot of the point-spread function for linearly polarized illumination. The horizontal axis lies in the focal plane and is perpendicular to the direction of vibration of the incident electric field. The numerical aperture of the oil ($n = 1.518$) immersion lens is 1.4; the wavelength is 633 nm. The point-spread function is normalized to unity. The contour lines drop as follows: 0.9, 0.7, 0.5, 0.2, 0.07, 0.03, 0.015, and 0.005. They are indicated by decreasing line thicknesses. This applies to all contour plots shown in this paper.

polarized and has a wavelength of 725 nm. This condition yields the somewhat different point-spread function¹⁹ shown in Fig. 3:

$$h_{\text{det}} = |I_0|^2 + 2|I_1|^2 + |I_2|^2. \quad (3)$$

The confocal point-spread function is given by the product of the two point-spread functions and is denoted by H :

$$H = h_{\text{ill}} h_{\text{det}}. \quad (4)$$

The function H is proportional to the probability of an illumination photon's both exciting a fluorophore in the vicinity of the geometrical focus and detecting a photon emitted from the same position.^{6,20}

The basic idea of the 4Pi confocal fluorescence microscope is to use two microscope objectives with a common focus to increase the aperture of the microscope. An increase of the aperture along the axial direction is achieved either when the objectives are illuminated with coherent wave fronts that are interfering constructively in the common focus or when the fluorescent light that is collected from both sides interferes constructively in the common point detector. Since a solid angle of 4π is not achievable, the term 4Pi was chosen to indicate the basic idea with a simple and straightforward term.

Apart from operating as a confocal fluorescence microscope, the 4Pi confocal fluorescence microscope comprises three different types of imaging that feature a higher resolution:

Type A: The two illuminating wave fronts interfere in the sample (4Pi illumination):

$$H_{4\text{Pi,ill}} = |E_{1,\text{ill}} + E_{2,\text{ill}}|^2 |E_{\text{det}}|^2. \quad (5)$$

Type B: The two detection wave fronts interfere in the detector (4Pi detection):

$$H_{4\text{Pi,det}} = |E_{\text{ill}}|^2 |E_{1,\text{det}} + E_{2,\text{det}}|^2. \quad (6)$$

Type C: Both the illuminating and the detecting wave fronts interfere (4Pi illumination and 4Pi detection):

$$H_{4\text{Pi,4Pi}} = |E_{1,\text{ill}} + E_{2,\text{ill}}|^2 |E_{1,\text{det}} + E_{2,\text{det}}|^2. \quad (7)$$

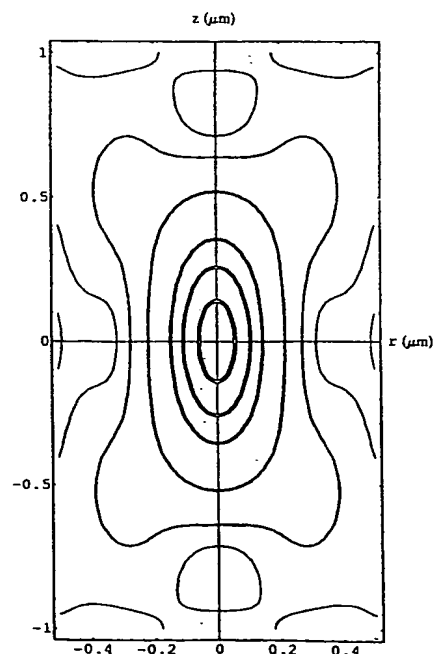


Fig. 3. Contour plot of the detection point-spread function. The numerical aperture of the lens is 1.4, the detection wavelength is 725 nm, and the index of refraction is $n = 1.518$.

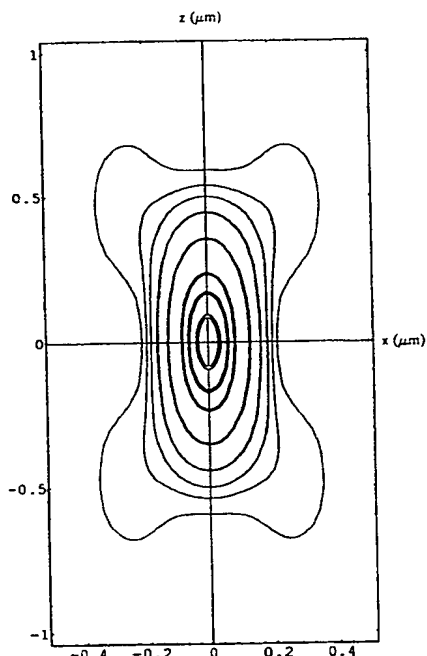


Fig. 4. Contour plot of the confocal point-spread function. It is the product of the functions shown in Figs. 2 and 3.

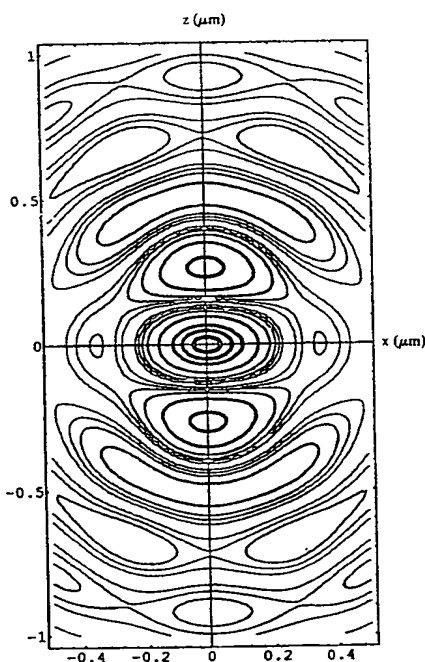


Fig. 5. Contour plot of the illumination point-spread function in a type-A 4Pi confocal fluorescence microscope. The two illumination wave fronts interfere constructively in the common focus. Both lenses have a numerical aperture of 1.4; the wavelength is 633 nm. The wave fronts are linearly polarized, and the x axis is perpendicular to the plane of vibration of the incident electric field.

THEORETICAL RESULTS

Contour plots of the different point-spread functions are shown in Figs. 2–8. Figure 5 illustrates the illumination point-spread function for a 4Pi confocal fluorescence mi-

croscope that uses two microscope objectives of N.A. = 1.4 (oil) and $\lambda = 633$ nm and linearly polarized light. The horizontal observation axis is perpendicular to the plane of vibration of the excitation light ($\phi = \pi/2$). The first minimum along the axial direction is found at $z = \pm 142$ nm away from the focal point. This is five times

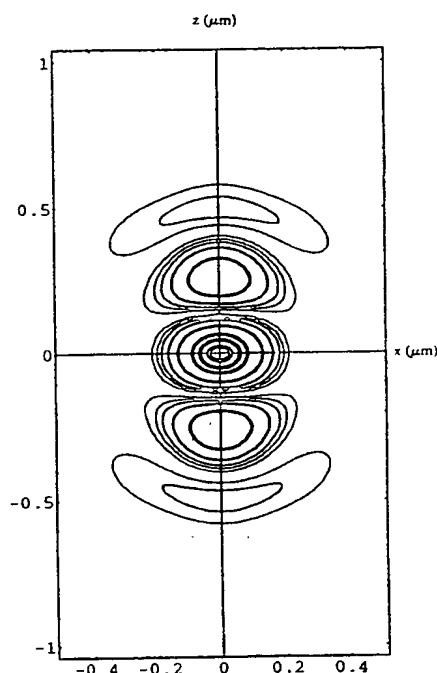


Fig. 6. Contour plot of the confocal point-spread function in a type-A 4Pi confocal fluorescence microscope. This point-spread function is calculated by multiplying the point-spread function for the normal detection (Fig. 3) and the point-spread function shown in Fig. 5.

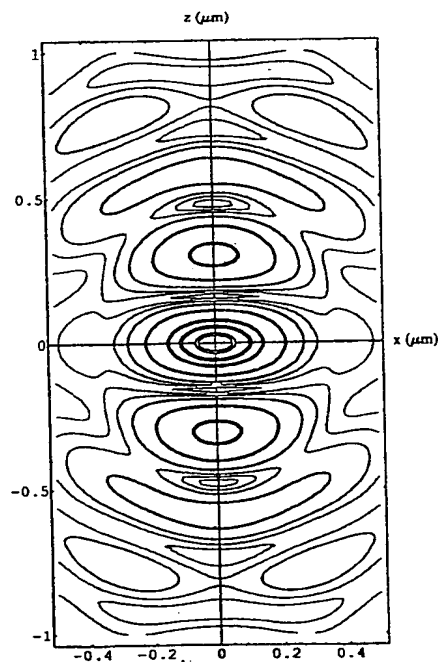


Fig. 7. Contour plot of the detection-intensity point-spread function in a type-B or type-C 4Pi confocal fluorescence microscope.

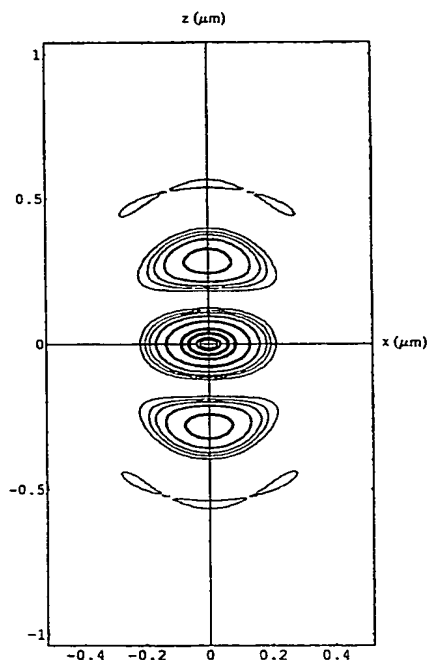


Fig. 8. Contour plot of the confocal point-spread function in a type-C 4Pi confocal fluorescence microscope. This point-spread function is calculated by multiplying the point-spread functions shown in Figs. 5 and 7.

less than in the case of normal illumination with the first minima at $z = \pm 705$ nm. However, the lack of a complete spherical wave front and the presence of aplanatic illumination force additional elevations along the optical axis that reach peak values of 0.58.

For calculation of the resolution of the type-A 4Pi confocal fluorescence microscope (4Pi illumination and normal detection), the illumination point-spread function as shown in Fig. 5 must be multiplied by the detection point-spread function as it is shown in Fig. 3. The result is displayed in Fig. 6, where the confocal point-spread function for a type-A 4Pi confocal fluorescence microscope can be seen. The full width at half-maximum reaches a value of approximately 138 nm in axial direction, which is a great improvement in axial resolution. As a result of the multiplication with the detection point-spread function, the peak height of the axial side elevations is reduced to 0.4. These elevations, however, reduce the benefit of the improved full width at half-maximum.

Figure 7 shows the detection point-spread function for the constructive interference of the detection wave fronts. The longer wavelength and the random polarization lead to a detection point-spread function that is different from the illumination point-spread function shown in Fig. 5. Figure 8 shows the point-spread function for a type-C 4Pi confocal fluorescence microscope (4Pi illumination and 4Pi detection), with constructive interference assumed for both illumination and detection. The location of the first minimum is nearly the same as for a type-A 4Pi confocal fluorescence microscope, but the upper and lower elevations have the somewhat lower value of 0.32 (Table 1).

Confocal fluorescence microscopy is of interest mainly because of its ability to resolve object planes that are stacked vertically along the optical axis.^{21,22} To quantify the axial resolution for planes, we calculated the intensity

signal $I_{\text{layer}}(z)$ (z responses) for an infinitely thin fluorescent layer by integrating the three-dimensional point-spread function in the x - y plane:

$$I_{\text{layer}}(z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h_{\text{ill}}(x, y, z) h_{\text{det}}(x, y, z) dx dy \quad (8)$$

The calculated z responses of a confocal fluorescence microscope and a 4Pi confocal fluorescence microscope to a fluorescence layer along the optical axis are shown in Fig. 9. The full width at half-maximum of the central peak in axial direction for a type-A 4Pi confocal fluorescence microscope (N.A. = 1.4; $\lambda = 633$ nm) is 138 nm, while that for a comparable confocal fluorescence microscope is 540 nm. The heights of the side elevations along the optical axis direction reach a value of 0.46. The z response for a type-A 4Pi confocal fluorescence microscope is within the envelope of the z response of the confocal fluorescence microscope. For a type-C 4Pi confocal fluorescence microscope, these elevations have a value of 0.32, and the full width at half-maximum of the central peak is 105 nm.

The response to an infinitely steep edge can be computed by integrating the z response along the optical axis:

$$I_{\text{edge}}(z) = \int_{-\infty}^z I_{\text{layer}}(z') dz' \quad (9)$$

$I_{\text{edge}}(z)$ functions are shown in Fig. 10. They are of great interest because they can be measured by focusing into a homogeneously fluorescent thick object.

4PI CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPE

In the 4Pi confocal fluorescence microscope at the European Molecular Biology Laboratory, the optical system is at rest and the specimen is moved through the common focus of two microscope objective lenses. All the optomechanical parts are mounted upon a flat optical bench plate (Fig. 11). The light of a helium-neon laser is focused into a 10- μ m pinhole (PH) and collimated with a 250-mm lens. This beam passes a dichroic (DC) beam splitter, is separated into two coherent beams of equal intensity in a beam-splitter cube, and is directed to the microscope objective lenses by further mirrors. The two beams are focused in a common focal plane. Fluorescent light that is emitted in all directions is collected by both lenses. The emission beams partially follow the path of the excitation light but are deflected toward the detector. A 250-mm

Table 1. Summary of Theoretical Predictions^a

Variable	Microscope		
	CFM	4 Pi (Type A)	4 Pi (Type C)
Axial FWHM central peak	1	0.26	0.20
Total volume	1	0.50	0.32
Height, upper/lower elevation	—	0.46	0.32

^aAll calculations are normalized to the same height of the central peak. The numerical aperture of the oil ($n = 1.518$) immersion lenses is 1.4, the excitation wavelength is 633 nm, and the emission wavelength is 725 nm. CFM, confocal fluorescence microscope; FWHM, full width at half-maximum.

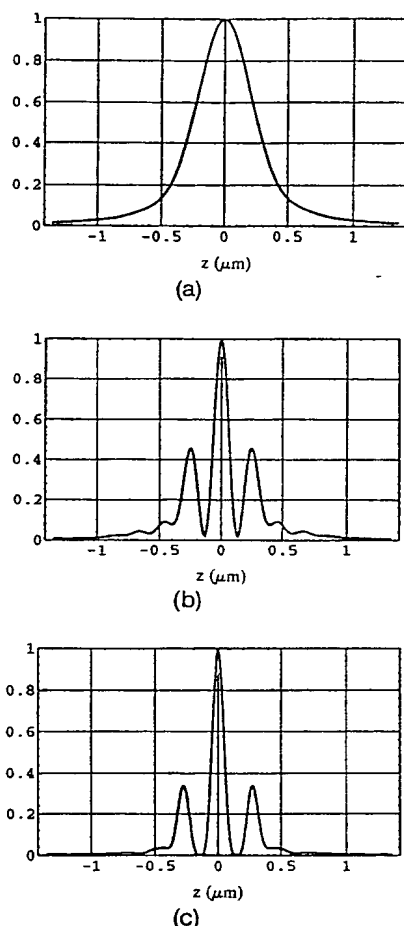


Fig. 9. Theoretical (z) responses to an infinitely thin fluorescent layer: (a) the response of a confocal fluorescence microscope, (b) the response of a type-A 4Pi confocal fluorescence microscope, (c) the response of a type-C 4Pi confocal fluorescence microscope. In all three cases, objective lenses with an N.A. of 1.4, an excitation wavelength of 633 nm, and an emission wavelength of 725 nm were assumed.

lens focuses the light into a 50- μm -diameter pinhole, a 3- or 6-mm thick RG665 long-pass filter rejects the 633-nm excitation light, and the fluorescence emission is detected with a red-sensitive Hamamatsu 647-01 photomultiplier.

Specimen movement is accomplished with a piezoelectrically driven scan stage (Photon Control, Cambridge, England) that offers independent x , y , and z axes. The maximal distance per axis is 20 μm , and the smallest resolvable step is 5 nm. While one of the microscope objective lenses is fixed, the position of the other lens is piezoelectrically adjustable along independent x , y , and z axes (Physik Instrumente, Waldbronn, Germany). The dichroic beam splitters are operated with an incidence angle of 45°, and, in contrast to most other dichroic beam splitters, transmit the 633-nm light of the laser, while 80% of the fluorescently emitted light above 650 nm is deflected.

EXPERIMENTAL RESULTS

To prove the principle of 4Pi confocal fluorescence microscopy and the predicted enhancement in axial resolution,

we prepared a layer of Nile Blue A Perchlorate (Kodak Optical Products, CAS No.:53340-16-2) that was immersed in ethanol and mounted between two cover slides. This sample provides an edge along the optical axis. A saturated solution of Nile Blue was used to produce a good signal-to-noise-ratio (SNR). A transmission loss along a distance of 5 μm was below the detection limit.

The sample was placed between the two microscope objective lenses (Zeiss Planapochromat 63 \times /1.4 oil or 100 \times /1.4 oil) and was moved through their common focus. The size of the increments was 10 nm. The scan speed was 0.5 $\mu\text{m/s}$. The excitation power of the laser was reduced until no bleaching occurred. The measurements of the axial resolution were performed with fluorescent layers that were between 500 nm and 5 μm thick. The signal of interest was the response of the optical system to a step along the optical axis, i.e., the function $I_{\text{edge}}(z)$ as described by Eq. (9). We measured the response of the type-A 4Pi confocal fluorescence microscope with both objective lenses; we measured the confocal fluorescence response with a single objective lens by closing the other path.

Figure 12 shows the intensity signal for a 590-nm-thick fluorescent layer as a function of the position along the optical axis. The slopes correspond to the function $I_{\text{edge}}(z)$

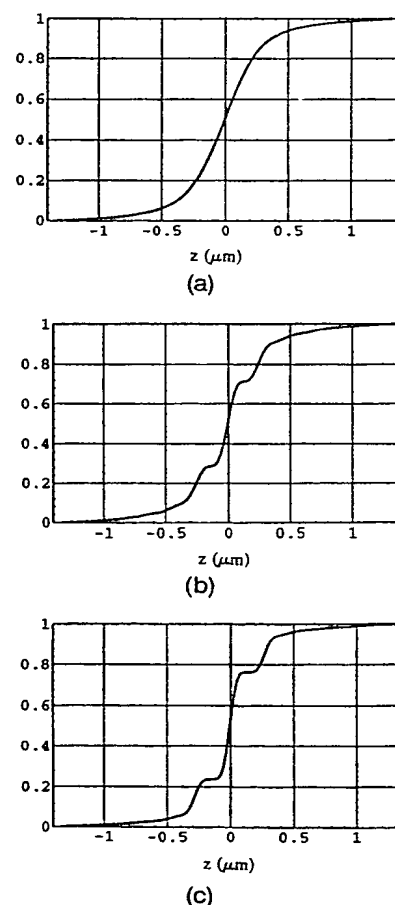


Fig. 10. Theoretical response to an edge along the optical axis: (a) the response of a confocal fluorescence microscope, (b) the response of a type-A 4Pi confocal fluorescence microscope, (c) the response of a type-C 4Pi confocal fluorescence microscope.

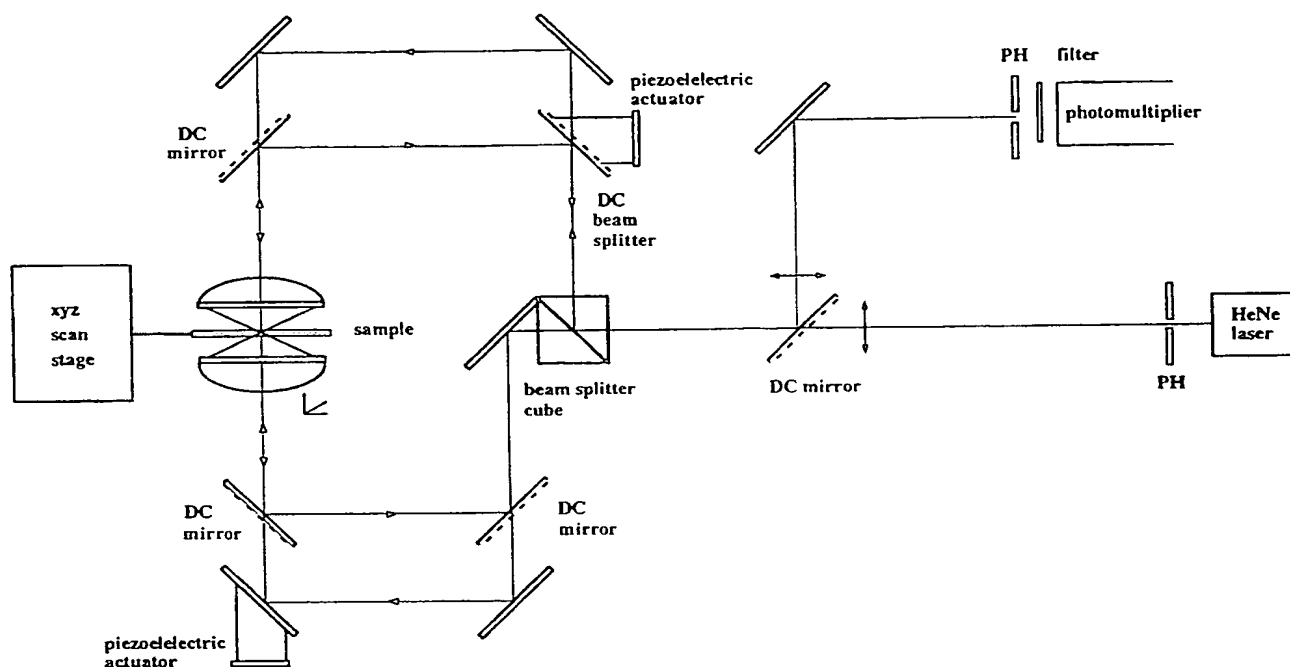


Fig. 11. Schematic drawing of the 4Pi confocal fluorescence microscope at the European Molecular Biology Laboratory.

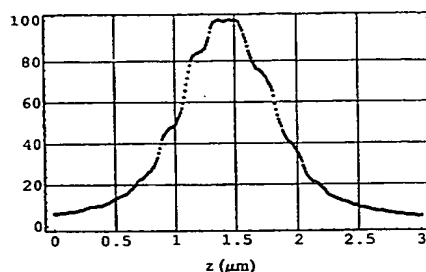


Fig. 12. Experimental response of a type-A 4Pi confocal fluorescence microscope to a 590-nm-thick fluorescent layer. The intensity is normalized to 100. The distance along the optical axis (z) is given in micrometers.

for the edges of the layer. Their first derivatives [i.e., the experimentally gained curve $I_{\text{layer}}(z)$ or z response] are shown in Fig. 13 for the type-A 4Pi confocal fluorescence microscope [Fig. 13(a)] and the confocal fluorescence microscope [Fig. 13(b)]. The experiment clearly demonstrates that the z responses for the type-A 4Pi confocal fluorescence microscope are within the envelope of the confocal fluorescence microscope z responses. Clearly distinguishable are the center peak and at least two upper and lower peaks [Fig. 13(b)]. The distance between the first two minima is 242 nm. The lower peak and the upper peak are, respectively, 235 and 195 nm apart from the main peak. The heights of the upper and lower peaks are between 62% and 66% of the central peak. The full width at half-maximum of the central peak is approximately 110 nm. The full width at half-maximum for the confocal fluorescence microscope is larger than 550 nm. All distances and lengths given are precise within a range of 20 nm, i.e., twice the movement increments that were used in these experiments. For this experiment the calculated full width at half-maximum for the confocal fluorescence microscope is 540 nm, the calculated distance

between the first two minima is 270 nm, the theoretical heights of the axial side elevations are 46% of that of the central peak, and the theoretical full width at half-maximum of the central peak is 138 nm.

The phase was adjusted with the piezoelectrically driven mirror in the illumination path. Deliberate changes in phase caused the intensity steps to move along the slope. Two wave fronts that were not in phase resulted in asymmetrically sized upper and lower elevations as well as in

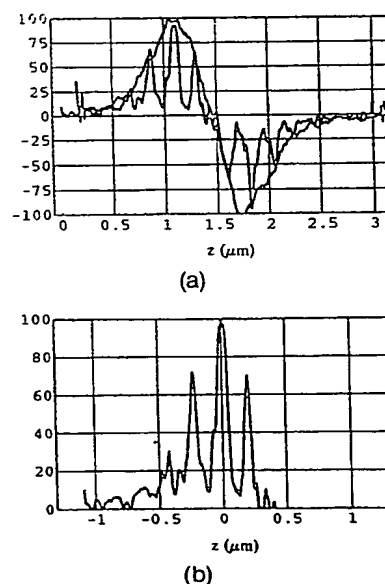


Fig. 13. First derivative of the experimental responses to a fluorescent layer shown in Fig. 12. (a) The z responses of the type-A 4Pi confocal fluorescence microscope and the z responses of the confocal fluorescence microscope (envelope), (b) the z response shown in the same scale as the theoretical predictions for this experiment.

smaller central peaks. In the case of destructive interference, the central peak vanished.

DISCUSSION AND OUTLOOK

A comparison of theory and data shows good agreement, which proves the basic principle of 4Pi confocal fluorescence microscopy and shows the feasibility of such an instrument. The theoretical prediction is confirmed—that the response of the 4Pi confocal fluorescence microscope is within the envelope of the response of a confocal fluorescence microscope. The facts that the upper and lower elevations are 39% higher, the center peak 24% narrower, and the response of the confocal fluorescence microscope approximately 11% broader than calculated can be explained consistently by an apodization of the wave fronts that pass the objective lenses. This explanation is plausible because immersion oil objective lenses with an N.A. = 1.4 feature the largest technically possible aperture angle. Simple considerations on the focusing process (see Fig. 1) suggest that a decrease of the aperture causes the wave fronts to behave somewhat more as planar waves. This effect leads to a narrower central peak, a reduced distance between the first minima (for two planar waves a distance of $\lambda/2n = \sim 210$ nm is expected), and higher side elevations relative to the central peak. It is clear that in the limiting case of planar waves, the central peak and the side elevations reach equal heights. In addition, the shrinkage of the axial extent of the main maximum of the point-spread-function with respect to its lateral extent is a high-numerical-aperture effect.²³ Furthermore, the calculations are based on a single wavelength of 725 nm, whereas the detected range is 665–820 nm. The latter and perhaps chromatic aberrations broaden the detection point-spread function and lead to increased side elevations and broader z discrimination. These phenomena have not been fully investigated, and more research in this field is needed.

When comparing the SNR of a confocal fluorescence microscope with that of a 4Pi confocal fluorescence microscope, we have to take into account the limited amount of fluorophore per unit volume and the maximum light intensity with which it is possible to illuminate without damaging the sample. Because of constructive interference of the two illumination wave fronts in a 4Pi confocal fluorescence microscope, the same maximal amplitude can be achieved when the objective lenses provide only one half of the illumination amplitude each. Thus only one fourth of the illumination intensity is needed for each objective. Since two wave fronts are used, the 4Pi confocal microscope requires only one half of the light to achieve the desired intensity in the focus. Thus the sample is exposed to only one half of the light, thereby yielding better protection against out-of-focus bleaching. Since the 4Pi microscope detects the light on both sides, the signal becomes twice as large. On the other hand, because of the enhanced resolution, the fluorescence light emanates from an object volume that is only one half of that in a confocal microscope. Therefore the 4Pi confocal fluorescence microscope is able to provide the same intensity and SNR as those of a confocal fluorescence microscope despite the fact that it probes a smaller volume. The 4Pi microscope currently available at the European Molecular Biology

Laboratory loses 50% of the fluorescence emission, but this can be easily avoided with an improved arrangement.

The data presented in this paper show that a 4Pi microscope is feasible and has the properties that were expected. To exploit the full width at half-maximum of the central peak, one must reduce the heights of the upper and lower elevations or at least take them into account mathematically. An image would suffer from ghost images produced by these elevations. Changes in the phase of the two wave fronts force variations between constructive and destructive interference. Heterogeneity of the refractive index in the sample causes variations in the spot sizes and in the positions of the spots. However, the 4Pi microscope will always have a resolution that is better than that of a confocal fluorescence microscope.

A number of further approaches can be conceived that exploit the features of a 4Pi microscope: (a) The additional use of two-photon excitation introduces another intensity squaring.^{24,25} The net effect is a reduction of the upper and lower elevations. (b) A possible reduction of the upper and lower elevations can also be achieved by applying suitable superresolving aperture filters. (c) The data can be deconvolved numerically since the information is well defined and the SNR is at least as good as that in a confocal fluorescence microscope. (d) Different combinations of (partly) destructive and (partly) constructive illumination point-spread functions are possible. (e) The phase difference of the two wave fronts can be modulated. Images are recorded as a function of phase and position along the optical axis, and this information is then used to estimate the actual phase and to deconvolve the images. This fifth approach seems to us the most promising, since it addresses all the problems mentioned above.

This paper is to our knowledge the first to prove the feasibility of resolution enhancement based on an increase of the numerical aperture in fluorescence microscopy. A fourfold increase of the axial resolution can be used to provide new insights into the structure and function of many organelles that are currently being investigated in modern cell biology. In conclusion, we believe that 4Pi confocal fluorescence microscopy has strong potential as a future instrument for three-dimensional light microscopy.

ACKNOWLEDGMENTS

S. Hell thanks the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bonn, Germany) for supporting his study on resolution enhancement in confocal microscopy with a postdoctoral fellowship. We thank Chr. Cremer for his constant interest and valuable discussions. K. Simons and S. Hunklinger supported this study during its earliest stages.

REFERENCES

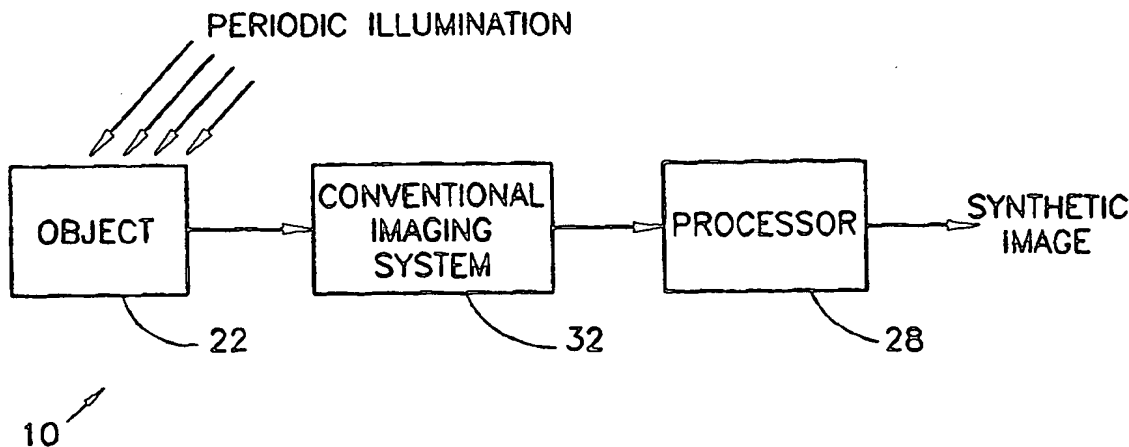
1. T. Wilson, "Confocal microscopy," in *Confocal Microscopy*, T. Wilson, ed. (Academic, London, 1990).
2. M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics*, 5th ed. (Pergamon, Oxford, 1975).
3. M. V. Klein and T. E. Furtak, *Optics*, 2nd ed. (Wiley, New York, 1986).
4. D. Gerlach, *Das Lichtmikroskop* (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1976).
5. S. Hell, German patent application P40 40 441.2 (filed December 18, 1990; published 1992).

6. S. Hell, "The physical basis of confocal fluorescence microscopy," presented as part of the Scandinavian Course in Modern Image Analysis Technology, Jyväskylä, Finland; *Solubilogi* 3, 183-185 (1991).
7. S. Hell and E. H. K. Stelzer, "A 4Pi confocal microscope has an improved axial resolution," presented at the 4th International Conference on Confocal Microscopy, Amsterdam, The Netherlands, 1992.
8. C. J. R. Sheppard and Y. Gong, "Improvement in axial resolution by interference confocal microscopy," *Optik* 87, 129-132 (1991).
9. K. Carlsson, P. E. Danielsson, R. Lenz, A. Liljeborg, L. Majlöf, and N. Åslund, "Three-dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope," *Opt. Lett.* 10, 53-55 (1985).
10. R. W. Wijnaendts-van-Resandt, H. J. B. Marsman, J. Davoust, E. H. K. Stelzer, R. Stricker, "Optical Fluorescence microscopy in three dimensions," *J. Microsc.* 138, 29-34 (1985).
11. G. J. Brakenhoff, H. T. M. van der Voort, E. A. Spronsen, and H. Nanninga, "Three-dimensional imaging by confocal scanning microscopy," *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 483, 405-415 (1986).
12. C. J. R. Sheppard and C. J. Cogswell, "Three-dimensional imaging in confocal microscopy," in *Confocal Microscopy*, T. Wilson, ed. (Academic, London, 1990).
13. T. Wilson and C. J. R. Sheppard, *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Academic, London, 1984).
14. C. J. R. Sheppard and H. J. Matthews, "Imaging in high-aperture optical systems," *J. Opt. Soc. Am. A* 4, 1354-1360 (1987).
15. B. Richards and E. Wolf, "Electromagnetic diffraction in optical systems, I. An integral representation of the image field," *Proc. R. Soc. London Ser. A* 253, 349-357 (1959).
16. B. Richards and E. Wolf, "Electromagnetic diffraction in optical systems, II. Structure of the image field in aplanatic systems," *Proc. R. Soc. London Ser. A* 253, 358-368 (1959).
17. A. Boivin, J. Dow, and E. Wolf, "Energy flow in the neighborhood of the focus of a coherent beam," *J. Opt. Soc. Am.* 57, 1171-1175 (1967).
18. J. J. Stamnes, *Waves in Focal Regions* (Hilger, Bristol, England, 1986), p. 468.
19. H. T. M. van der Voort and G. J. Brakenhoff, "3-D image formation in high-aperture fluorescence confocal microscopy: a numerical analysis," *J. Microsc. (Oxford)* Pt. 1 158, 43-54, (1990).
20. S. Hell, E. Lehtonen and E. H. K. Stelzer, "Confocal fluorescence microscopy: wave optics considerations and applications to cell biology," in *New Dimensions of Visualization in Biomedical Microscopies*, A. Kriete, ed. (Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1992).
21. T. Wilson, "Optical sectioning in confocal fluorescent microscopes," *J. Microsc. (Oxford)* 154, 143-156 (1989).
22. E. H. K. Stelzer and R. W. Wijnaendts-van-Resandt, "Optical cell slicing with the confocal fluorescence microscope: microtomoscopy," in *Confocal Microscopy*, T. Wilson, ed., (Academic, London, 1990).
23. S. Hell, "Abbildung transparenter Mikrostrukturen im konfokalen Mikroskop," Ph.D. dissertation (Universität Heidelberg, Heidelberg, Germany, 1990).
24. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science* 248, 73-76 (1990).
25. S. Hell and E. H. K. Stelzer, "Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal microscope using two-photon excitation," *Opt. Commun.* (to be published).

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : G06T 5/00		A1	(11) International Publication Number: WO 97/06509
			(43) International Publication Date: 20 February 1997 (20.02.97)
(21) International Application Number: PCT/US96/12276 (22) International Filing Date: 25 July 1996 (25.07.96) (30) Priority Data: 08/510,632 3 August 1995 (03.08.95) US 08/583,350 5 January 1996 (05.01.96) US (71) Applicant (for all designated States except US): GIM SYSTEMS LTD. [IL/IL]; Matam 20 Building, P.O. Box 600, 31000 Haifa (IL). (71) Applicant (for TJ only): FRIEDMAN, Mark, M. [US/IL]; 1 Alharizi Street, 43406 Raanana (IL). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): BEN-LEVY, Meir [IL/IL]; 1 Kadish Luz, 32159 Haifa (IL). PELEC, Eyal [IL/IL]; 155 Hadarim, 42823 Zoran (IL). (74) Common Representative: FRIEDMAN, Mark, M.; c/o Sheinbein, Robert, 2940 Birchtree Lane, Silver Spring, MD 20906 (US).		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published With international search report.	

(54) Title: IMAGING MEASUREMENT SYSTEM



(57) Abstract

An apparatus for, and method of, improving the resolution of a conventional imaging system (32) by effectively increasing the bandwidth of an imaging system's transfer function. An object is first illuminated with periodic illumination. The phase of the periodic illumination is varied while the periodic illumination is used to scan the object. A plurality of images are received by an imaging system whereby the images received correspond to variations in the phase of the periodic illumination. These images are subsequently processed (28) to extract information in phase with the periodic illumination and information 90 degrees out of phase with the illumination.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Larvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

IMAGING MEASUREMENT SYSTEM

FIELD AND BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention relates to a system for enhancing the resolution of imaging systems by using a periodic pattern illumination.

5 Conventional imaging systems today, are characterized by a finite and limited optical system bandwidth. This limitation manifests itself in an optical system's optical transfer function (OTF). The transfer function of most imaging systems, including optical and electronic microscopes, characterizes a system by relating the spatial frequencies of an observed
10 object or target, to those frequencies of contained in a formed image. Many times, however, the resolution of such conventional imaging systems is not sufficient. In order to improve the resolution of an imaging system, it is necessary to extend the bandwidth of its transfer function. Increasing the bandwidth of the transfer function allows higher frequencies to be
15 transmitted to the image. Several optical scanning systems have already been developed for just this purpose, such as the Confocal Microscope and the Near Field Microscope.

A transform space scanning imaging apparatus and method are disclosed in U.S. Patent No. 4,929,951. The invention utilizes a different
20 technique of generating a synthetic image from that of the present invention. The invention disclosed by the '951 patent utilizes a non-imaging receiver rather than a basic conventional imaging system. In addition, the invention fails to synthesize the transfer function of the object.

25 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention overcomes the limitations of the prior art by providing an imaging system that illuminates an object with periodic illumination whose phase characteristics are varied in a uniform and consistent manner. The scattered illumination is received by an imaging

device and processed to create a synthetic image. The processed synthetic image has a new transfer function that has an enhanced high frequency response.

The present invention discloses an imaging system which transforms
5 information from an object plane to a synthetic image plane with an improved transfer function. The information at the object plane is considered to be a multiplication of the illumination function with the target (i.e. object) function, which may be transmission, reflection or any other physical function which defines the interaction of the target with the
10 illumination. Thus, the information at the object plane is actually created by the mixing of the illumination and the target information. Therefore, certain spatial frequencies observed at the image plane, may represent different frequencies of the observed target. Considering this interaction of illumination and target, the object of the present invention is to provide
15 an apparatus for and method of improving the transmission of certain bands of frequencies of the target through an imaging system by choosing a suitable illumination function and suitable image processing.

The simplest case is to use a sine function as the illumination function. The mixing of the target with this illumination is a simple shift
20 of the target frequencies by the illumination frequency. It is also possible that a periodic pattern consisting of several harmonics added together be used. The information carried by each harmonic can be readily identified. In the case of optical imaging, the periodic pattern may be created by imaging an optical grating and projecting the image upon the target.

25 In addition, phase information can be extracted. Typically, the phase of a real function may be determined by adding an imaginary part using the Hilbert transform. In the case of harmonic or periodic illumination, the phase of an image relative to the phase of the illumination can be measured. The information which is in phase with the illumination

yields the real part of the image and the information which is 90 degrees out of phase will yield the imaginary part.

Hence, there is provided according to the teachings of the present invention, a method of improving the resolution of imaging systems, for
5 imaging an object, comprising the steps of illuminating the object with a periodic pattern, scanning the object with the periodic pattern whereby the phase of the periodic pattern is varied, receiving a plurality of images, representing the periodic pattern scattered off the object, the images corresponding to variations in the phase of the periodic pattern, producing
10 synthetic images by processing the plurality of images to extract information in phase with the periodic pattern and information 90 degrees out of phase with the periodic pattern.

There is also provided, according to the teachings of the present invention, an apparatus for enhancing the resolution of an imaging system,
15 for imaging an object, comprising an energy source, periodic means for producing an illuminating periodic pattern in one dimension from the energy, the periodic means movable in one dimension whereby the phase of the periodic pattern may be varied in one dimension, first imaging means for passing the periodic pattern from the periodic means through to
20 the object whereby the object scatters the periodic pattern, second imaging means coupled to the first imaging means, the second imaging means for converting the scattered energy into an electrical signal, the electrical signal representing images of the scattered energy, processing means coupled to the periodic means and the imaging means, the processing
25 means for controlling the periodic means in one dimension, the processing means for extracting information in phase with the periodic pattern and information 90 degrees out of phase with the periodic pattern.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The invention is herein described, by way of example only, with reference to the accompanying drawings, wherein:

FIG. 1 is a high level block diagram of a preferred embodiment of
5 the present invention;

FIG. 2 is a detailed block diagram of a preferred embodiment of the present invention;

FIG. 3A is a diagram of the optical transfer function of the basic imaging system;

10 FIG. 3B is a diagram of the transfer function of the synthetic image, S_1 ;

FIG. 3C is a diagram of the transfer function of the synthetic image, S_2 ; and,

FIG. 4 illustrates an optical imaging measurement system.

15 DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

The present invention discloses an apparatus for and method of extending the bandwidth of a conventional imaging system by illuminating an object with periodic illumination, varying the phase of the illumination and processing the received scattered images to extract amplitude and
20 phase data.

The principles and operation of the present invention may be better understood with reference to the drawings and the accompanying description.

The present invention describes a system 10 of enhancing the
25 measuring capability of imaging systems. The basic concept behind the present invention, as described above, is to scan an object with periodic illumination, vary the phase of the periodic illumination and capture the scattered image. The received data is processed to produce synthetic

images. Amplitude and phase information is then extracted about the object.

As shown in Figure 1, an object 22 is first scanned with periodic illumination. Object 22 scatters the illumination falling on it. Imaging means including a conventional imaging system 32 receives the scattered light image and converts it into electrical signals. A processor 28 performs image processing functions on the received data and forms a complex synthetic image whereby the amplitude and phase information about can be determined. This data is then processed further depending on the particular application and/or displayed on a screen. The functions (i.e. control, image processing, etc.) that processor 28 performs may be realized by more than one actual processor. Many processors may be utilized to better distribute the tasks system 10 must perform. Similarly, imaging system 32 may include one or more subimaging systems whereby each subimaging system contributes to a portion of imaging system 32.

There exist alternative ways to scan an object by periodic illumination. If coherent light is used to illuminate the object, it is possible to create an illumination pattern using the interference of two or more coherent light beams. The scanning effect is achieved by shifting the phase of the beams. If incoherent light is used to illuminate the object, it is possible to create an illumination pattern using a moving grating, whose image is projected onto the object or target. The grating is movable in one or more dimensions. It is also possible to illuminate the object with partially coherent light. Partially coherent light is neither purely coherent or purely incoherent but somewhere in between. Scanning of the object may be performed in one or more dimensions.

The mathematical procedures and processes involved in generating synthetic images are presented below. First, the case involving one dimension is described followed by the case involving two dimensions.

The object is illuminated with energy, amplitude or any other physical quality that is significant to the measurement, having a space distribution $L(t,x)$, which is a good approximation at the range of interest:

$$(1) \quad L(t,x) = A_0 + A_1 \cos(2\pi x/\delta + \omega t + \psi_1) + A_2 \cos(4\pi x/\delta + 2\omega t + \psi_2) + \dots$$

$L(t,x)$ is a periodic function in x , with period equal to δ . The function in Eq. (1) is written as a series of harmonics having spatial frequencies $0, 1/\delta, 2/\delta, 3/\delta, \dots$. A scanning process is carried out by either sequentially or continuously by varying the phase ωt of the illumination. The constant phase ψ_1, ψ_2, \dots is the phase of the illumination at $t = 0$ and $x = 0$. In the following description, ψ_1, ψ_2, \dots are ignored without any loss of generality, in order to shorten otherwise very long equations. A_0, A_1, \dots , are constants in time and in the x -axis. In the general case, they may vary in the y -axis. In this case, L , the illumination distribution in equation (1) will also be a function of y , the second spatial axis, so that $L = L(x,y,t)$. A special case in which L is also periodic in the y -axis will be discussed in a later section.

An alternative to continuous scanning is scanning using sequences of energy illumination whereby the phase changes in uniform discrete steps from one sequence to another. The illumination function, $L_n(x)$, in this case is given by:

$$(2) \quad L_n(x) = A_0 + A_1 \cos(2\pi x/\delta + 2n\pi/N) + A_2 \cos(4\pi x/\delta + 4n\pi/N) + \dots$$

Where $n = 1, 2, 3, \dots$ and N is an integer.

The result of illuminating the object with a periodic pattern, as described by $L(t,x)$ in Eq. (1), is an image which is continuously changing with time.

The image will have the form of $I(t,x,y)$ given by:

$$(3) \quad I(t,x,y) = B_0(x,y) + B_1(x,y) \cos(\omega t + \phi_1) + B_2(x,y) \cos(2\omega t + \phi_2) + \dots$$

If the object is illuminated with sequential energy illumination scanning $L_n(x)$, as described in Eq. (2), conventional imaging system 32 will produce a sequence of images having the form of $I_n(x,y)$ given by:

$$(4) \quad I_n(x,y) = B_0(x,y) + B_1(x,y)\cos(2n\pi/N + \phi_1) + B_2(x,y)\cos(4n\pi/N + \phi_2) + \dots$$

At this point, a pair of synthetic images, $S_1(x,y)$ and $S_2(x,y)$, are defined for each harmonic ω , 2ω , ..., $k\omega$. The definition for the k 'th harmonic is as given by:

$$(5) \quad B_k(x,y)\cos(k\omega t + \phi_k) = S_1(x,y)\cos(2k\pi x/\delta + k\omega t) + S_2(x,y)\sin(2k\pi x/\delta + k\omega t)$$

Since $\cos(2k\pi x/\delta + k\omega t)$ and $\sin(2k\pi x/\delta + k\omega t)$ are orthogonal functions, S_1 and S_2 are unique and well defined for any desired harmonic, k , as described in Eq. (5). In the case of sequential illumination of the object, the definition of $S_1(x,y)$ and $S_2(x,y)$ is given by the following equation:

$$(6) \quad B_k(x,y)\cos(2kn\pi/N + \phi_k) = S_1(x,y)\cos(2k\pi x/\delta + 2n\pi/N) + S_2(x,y)\sin(2k\pi x/\delta + 2n\pi/N)$$

It is important that N be large enough to avoid aliasing. The complex synthetic image S is defined by the following:

$$(7) \quad S(x,y) = S_1(x,y) + iS_2(x,y)$$

20 Where $i^2 = -1$.

Imaging system 10 processes and analyzes S_1 and S_2 (i.e. the complex synthetic image S) for a chosen k . This analysis is equivalent to finding the amplitude and phase of the Fourier transform of the received image, or equivalent to finding the sine and cosine transformations of $I(t,x,y)$ at the single frequency $k\omega$.

S_1 is produced by extracting the information in phase with the illuminating pattern, while S_2 is produced by extracting the information 90 degrees out of phase with the illuminating pattern.

The synthetic image, S , in (7), is "built up" from the linear combination of S_1 and S_2 . For the purpose of understanding the previous equations, S may be considered to be a vector in the complex plane, and S_1 and S_2 may be considered to be the complex components of S . Thus, 5 S_1 and S_2 may be thought of, respectively, as the projections of S on the real and imaginary axes of a complex plane.

Going back to (1), the object is illuminated by $L(t,x)$, which is a periodic function, represented as a cosine series. Illumination of the image results in an "output" represented by the cosine series given in (3) for 10 $I(t,x,y)$. This is a function of time at angular frequency, ω , where constant angular frequency represents a constant scanning rate. In (3), angular frequency, ω , is the same for each harmonic frequency (inverse time) component of the series representation of $I(t,x,y)$, while phase, ϕ , is different for each harmonic frequency component. Each harmonic 15 component is represented by a pair of amplitude, B_n , and phase, ϕ_n , values. Thus, (3) is a polar representation of $I(t,x,y)$. In (5), the cosine series representation of $I(t,x,y)$ is equivalently rewritten as the sum of a cosine and a sine series with constant phase. In (5), $I(t,x,y)$ is represented in rectangular form, since cosine and sine are orthogonal functions, at an 20 angle of 90-degrees. Thus the coefficients of the cosine and the sine harmonic series are orthogonal components of $I(t,x,y)$. Equation (5) gives the definition of the $S_1(x,y)$ and $S_2(x,y)$ as the coefficients of the cosine and sine components, respectively, of the B_n of (3). Thus, S_1 is the real part, and S_2 is the imaginary part of synthetic image $S(x,y)$ defined in (7). 25 The two components S_1 and S_2 are obtained by mathematically analyzing an "optical image" to obtain its in-phase and 90-degrees out-of-phase components, respectively, as will be discussed further later. Various synthetic images may be produced mathematical processing which may include one or more components obtained from the optical image.

For scanning in both the x and y axis, the definition is similar to the one axis case. For two axis, the illumination function is given by the approximation:

$$\begin{aligned}
 (8) \quad L_{mn}(x,y) = & A_0 + A_1 \cos(2\pi x/\delta_x + 2\pi m/M) \cos(2\pi y/\delta_y + 2\pi n/N) \\
 & + A_2 \cos(4\pi x/\delta_x + 4\pi m/M) \cos(2\pi y/\delta_y + 2\pi n/N) \\
 & + A_3 \cos(2\pi x/\delta_x + 2\pi m/M) \cos(4\pi y/\delta_y + 4\pi n/N) \\
 & + A_4 \cos(4\pi x/\delta_x + 4\pi m/M) \cos(4\pi y/\delta_y + 4\pi n/N) \\
 & + \dots
 \end{aligned}$$

10 Where $n, m = 1, 2, \dots$

A set of illuminations $L_{mn}(x,y)$, $m = 1 \dots M$ and $n = 1 \dots N$, will result in a set of images $I_{mn}(x,y)$. Synthetic images S_1, S_2, S_3 and S_4 are defined, which best fit $I_{mn}(x,y)$, in the following equation:

$$\begin{aligned}
 (9) \quad I_{mn}(x,y) = & S_1(x,y) \cos(2\pi x/\delta_x + 2\pi m/M) \cos(2\pi y/\delta_y + 2\pi n/N) \\
 & + S_2(x,y) \sin(2\pi x/\delta_x + 2\pi m/M) \sin(2\pi y/\delta_y + 2\pi n/N) \\
 & + S_3(x,y) \cos(2\pi x/\delta_x + 2\pi m/M) \sin(2\pi y/\delta_y + 2\pi n/N) \\
 & + S_4(x,y) \sin(2\pi x/\delta_x + 2\pi m/M) \cos(2\pi y/\delta_y + 2\pi n/N) \\
 & + \text{Constant} + \text{Residue}
 \end{aligned}$$

Where $m = 1 \dots M$, $n = 1 \dots N$, Constant is a constant and Residue is
 20 orthogonal residue of other harmonics of $1/\delta_x$ or $1/\delta_y$, and $1/M$ or $1/N$.

An example of a system that embodies the mathematical procedures and processing to extend the bandwidth of a conventional imaging system is illustrated in Figure 2. Shown in Figure 2 is a detailed block diagram of system 10. An energy source or light source 12 provides any type of
 25 electromagnetic radiation or energy such as coherent, incoherent or partially coherent light, microwave, infrared, ultraviolet, x-ray, radio, ultrasonic, etc. Energy from light source 12 passes through periodic means 14, which may be one grating for scanning in one dimension or two gratings for scanning in two dimensions, which is attached to motor 26.

Motor 26 can move grating 14 either in discrete steps or continuously and in one or more dimensions. Energy then passes through grating 14 through grating lens 16. Following grating lens 16, the energy passes through beam splitter 18. The energy then passes through object lens 20.

5 The energy then illuminates object 22 and is scattered by it. During the process of scattering of the illuminating energy by object 22, the energy, in reality, is actually heterodyned with the object. The scattered energy is reflected 90 degrees by beam splitter 18 so as to pass through camera lens 26 and into camera 30. Camera 30 receives the image of the

10 illumination scattered by object 22. Camera 30 converts the optical information received into electrical information suitable for processing by electronic processing means 28. One of the possible outputs from processor 28 is a display 36 showing a synthetic image of object 22.

In the example, energy (i.e. incoherent light) is used to illuminate

15 object 22, however, coherent or partially coherent light could also be used with similar results. The example also involves scanning only in one dimension to simplify the mathematics. However, the example could easily be extended to two dimensions using the same line of analysis.

Object 22 is illuminated with intensity distribution $L(t,x)$ as defined

20 by Eq. (1). It is assumed that the scattering of light from the object is linear with the intensity of the illumination. The intensity of light scattered by the object is $I_1(t,x)$ which is given by:

$$(10) \quad I_1(t,x) = C r(x) \cos(-2\pi x/\delta + \omega t) + \text{Res.}$$

Where:

25 $r(x)$ = object scattering function

Res. = higher harmonics of ω and direct current (DC)

C = constant

In Eq. (10), $r(x)$ is the scattering, reflection, transmission or any other physical function which defines the interactions of object 22 with the

30 illuminating light. If conventional imaging system 32, in Figure 1, is

incoherent, having a transfer function $T_0(f_x)$ where f_x is the spatial frequency in the x-axis. The following theorems (a) and (b) will be shown to be true:

- (a) The synthetic image S_1 , processed by system 10, as defined by Eq. (5), is a linear transformation of $r(x)$ having a transfer function $T_1(f_x)$, as given by:

$$(11) \quad T_1(f_x) = C\{T_0(f_x - 1/\delta) + T_0(f_x + 1/\delta)\}$$

Where C is a constant. S_1 represents image information in phase with the illumination.

- (b) The synthetic image S_2 , processed by system 10, as defined by Eq. (5) is a linear transformation of $r_2(x)$ having a transfer function $T_2(f_x)$, as given by:

$$(12) \quad T_2(f_x) = C\{T_0(f_x - 1/\delta) - T_0(f_x + 1/\delta)\}$$

Where $r_2(x)$ is the Hilbert transform of $r(x)$. S_2 represents information 90 degrees out of phase with the illumination.

The transfer functions T_1 and T_2 are shown in Figures 3B and 3C for the classical incoherent diffraction limited optical transfer function T_0 shown in Figure 3A. The cutoff frequency of transfer functions T_1 and T_2 is $f_G + f_{OTF}$. As is apparent from Figures 3A to 3C, the bandwidth of the synthetic images has been extended by f_G or $1/\delta$. It is important to note that while conventional imaging system 32 acts as a low pass filter at zero frequency, system 10 acts as a bandpass filter at the frequency of grating 14, f_G . To better understand this phenomenon, assume information about object 22 exists at a certain frequency f_0 and that $f_0 > f_{OTF}$. When object 22 is heterodyned or mixed with the periodic energy illumination, this frequency f_0 will be shifted up and down by frequency f_G . If one of the shifted frequencies, for example $f_0 - f_G$, is in the bandwidth of f_{OTF} , it will pass through optical imaging system 10 at this frequency. The processing performed by processor 28 shifts the information back to the original frequency f_0 .

To better understand the previous example, the following proof is presented. The following three trigonometric equations are required for this proof:

$$(13) \quad \cos(\alpha + \beta) = \cos(\alpha)\cos(\beta) - \sin(\alpha)\sin(\beta)$$

$$5 \quad (14) \quad \sin(\alpha + \beta) = \cos(\alpha)\sin(\beta) + \cos(\beta)\sin(\alpha)$$

$$(15) \quad \cos(\alpha)\cos(\beta) = 1/2[\cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta)]$$

Let $R(f_x)$ and $\phi(f_x)$ be the amplitude and phase of the Fourier transform of $r(x)$ (the object scattering function) in the x -axis so $r(x)$ in Eq. (10) takes the form of:

$$10 \quad (16) \quad r(x) = \int_{f_x} R(f_x) \cos(2\pi f_x x + \phi(f_x)) df_x$$

Giving:

$$(17) \quad I_1(t, x) = C \int_{f_x} R(f_x) \cos(2\pi f_x x + \phi(f_x)) \cos(-2\pi x/\delta + \omega t) df_x + \text{Res.}$$

Using Eq. (15) yields:

$$15 \quad (18) \quad I_1(t, x) = C_1 \int_{f_x} R(f_x) \cos(2\pi(f_x - 1/\delta)x + \phi(f_x) + \omega t) df_x \\ + C_1 \int_{f_x} R(f_x) \cos(2\pi(f_x + 1/\delta)x + \phi(f_x) - \omega t) df_x \\ + \text{Res.}$$

The intensity of the image, assuming incoherent imaging is given by:

$$19 \quad I_2(t, x) = C_1 \int_{f_x} T_0(f_x - 1/\delta) R(f_x) \cos(2\pi(f_x - 1/\delta)x + \phi(f_x) + \omega t) df_x \\ 20 \quad + C_1 \int_{f_x} T_0(f_x + 1/\delta) R(f_x) \cos(2\pi(f_x + 1/\delta)x + \phi(f_x) - \omega t) df_x \\ + \text{Res.}$$

Using Eq. (13) yields:

$$(20) \quad I_2(t, x) = C_1 \int_{f_x} T_0(f_x - 1/\delta) R(f_x) [\cos(2\pi f_x x + \phi(f_x)) \cos(-2\pi x/\delta + \omega t) \\ - \sin(2\pi f_x x + \phi(f_x)) \sin(-2\pi x/\delta + \omega t)] df_x \\ 25 \quad + C_1 \int_{f_x} T_0(f_x + 1/\delta) R(f_x) [\cos(2\pi f_x x + \phi(f_x)) \cos(2\pi x/\delta + \omega t) \\ - \sin(2\pi f_x x + \phi(f_x)) \sin(2\pi x/\delta + \omega t)] df_x \\ + \text{Res.}$$

Collecting all terms that multiply $\cos(-2\pi x/\delta + \omega t) = \cos(2\pi x/\delta - \omega t)$ and all terms that multiply $\sin(-2\pi x/\delta + \omega t) = -\sin(2\pi x/\delta - \omega t)$ yields:

$$30 \quad (21) \quad I_2(t, x) = C_1 \cos(2\pi x/\delta + \omega t)$$

13

$$\begin{aligned}
& * \int_{f_x} \{T_0(f_x - 1/\delta) + T_0(f_x + 1/\delta)\} R(f_x) \cos(2\pi f_x x + \phi(f_x)) df_x \\
& + C_1 \sin(2\pi x/\delta + \omega t) \\
& * \int_{f_x} \{T_0(f_x - 1/\delta) - T_0(f_x + 1/\delta)\} R(f_x) \sin(2\pi f_x x + \phi(f_x)) df_x \\
& + \text{Res.}
\end{aligned}$$

5 The synthetic images $S_1(x)$ and $S_2(x)$ derived from $I_2(t, x)$, as defined by Eq. (5), are given by:

$$(22) \quad S_1(x) = C_1 \int_{f_x} \{T_0(f_x - 1/\delta) + T_0(f_x + 1/\delta)\} R(f_x) \cos(2\pi f_x x + \phi(f_x)) df_x$$

$$(23) \quad S_2(x) = C_1 \int_{f_x} \{T_0(f_x - 1/\delta) - T_0(f_x + 1/\delta)\} R(f_x) \sin(2\pi f_x x + \phi(f_x)) df_x$$

The function $r(x)$ is given by Eq. (16):

$$10 \quad (16) \quad r(x) = \int_{f_x} R(f_x) \cos(2\pi f_x x + \phi(f_x)) df_x$$

The function $r_2(x)$ is the Hilbert transform of $r(x)$ and is given by:

$$(24) \quad r_2(x) = \int_{f_x} R(f_x) \sin(2\pi f_x x + \phi(f_x)) df_x$$

Eqs. (22) and (23) thus prove theorems (a) and (b) presented above.

Optical Microscope

15 Described above is a novel imaging system which uses a periodic pattern of illumination in order to improve the resolution of the imaging system. As will now be described, the present invention deals with the methods of applying the technology to optical microscopes in order to extend their resolution capabilities, and to integrate three dimensional
20 imaging capabilities in microscopy, which becomes possible by the use of periodic illumination.

In three dimensional capabilities we should consider:

- (a) the capability to image a thin slice within a thick volume,
- (b) the capability to identify the three dimensional information
25 within the thin slice,
- (c) the capability to create a three dimensional image of a thick volume by the integration of information related to several thin slices, and

- (d) the capability to focus on those slices where there is information and to ignore other slices.

The standard light microscope can not identify the three dimensional information in a thin or thick volume. In the case of a thick volume, the information at different slices in the volume may overlap so the microscope will not be able to create a sharp image of any slice.

The prior art Confocal Microscope was developed to answer these limitations. The Confocal microscope illuminates the target with a beam focused to a small area. To create an image of the whole field of view, the object is scanned with the beam. The Confocal Microscope can create a sharp image of a thin slice which is in the focal plane of the beam, with other slices not affecting the image. Three dimensional imaging of the thick volume is possible by imaging a sequence of thin slices.

The present invention discloses a new method for three dimensional imaging, based on periodic illumination. Compared with the Confocal Microscope, the present invention has the advantage of three dimensional imaging capability within a thin slice, and the advantage of improved lateral resolution as shown above in the previous discussion in this application. As with the confocal microscope, three dimensional imaging of the thick volume is possible by imaging a sequence of thin slices.

Description of the optical microscope of the present invention:

A method of imaging by optical microscope using a periodic illumination, will include three major steps:

- (1) Illumination the observed object by a periodic pattern of light,
- (2) Imaging of the object to a camera or detector to create a signal related to the object, and
- (3) Mathematically processing of the signal to create synthetic images of the object.

Definitions:

Illumination: The light illuminating the object may be ultraviolet, visible, infrared or any other electromagnetic wave. The illuminating pattern at the object plane may be periodic in one or two axes. We
5 consider two important ways to create a periodic pattern of illumination:

(1) The pattern may be created by two or more coherent beams which interfere with one another. In this case, the illumination pattern is also the interference pattern. The phase of the pattern is changeable by controlling the phase of the beams.

10 (2) The periodic illumination pattern may be an image of another pattern (source pattern), which has a periodic structure. In this case, the illumination is enabled by projecting the image of the source periodic pattern on the observed object.

The phase of the illumination pattern may be controlled by
15 physically moving the source pattern.

Alternatively, the pattern itself is controlled electrically. Such devices may be divided into two groups:

(1) The electrically controlled spatial filter is an optical filter whose transmission, reflection or other optical property are controllable at each
20 point of the filter in space. Such devices exist today, using the polarization properties of liquid crystals, such as are widely used as flat panel displays.

(2) The electrically controlled light source is a source of light for which the intensity emitted by each point in a certain space is controllable.
25 An example of such device is the Cathode Ray Tube (CRT) which is widely used in computer monitors.

Imaging: The imaging system is an optical microscope, which collects light resulting from the interaction of the illuminating pattern with the object, to create a magnified optical image of the object. This

magnified optical image of the object may be observed by the eyes or by a detector which transforms the optical image into an electrical signal. The imaging system and the optical illumination system which produces the periodic illumination pattern may share the same objective and other
5 optical components. Alternatively, these may be two different systems of objectives and optical components "coupled" by the fact that the image plane of one system coincides with the object plane of the other system. Useful information of the object may be obtained from the image only if there is some physical interaction between the light of the illumination and
10 the object. According to the optical configuration of the imaging system and according to the optical properties of the object, we may consider several such interactions. The interaction may be reflection, transmission, absorption, scattering, phase shifting, fluorescence, depolarization or any other physical interaction of light and matter.

15 Processing: The mathematical processing for the creation of one or several synthetic images is a mathematical analysis over a single optical image or over a sequence of optical images which are created while changing the phase of the illuminating pattern. The synthetic image is a mathematical function related to the object as an image, unlike the optical
20 image which represents a physical quality like the intensity of light at the image plane. In the preceding discussion, a useful set of synthetic images where analyzed by extracting information at the image plane. Information is extracted which is in phase with the phase of the illumination pattern, and information is extracted which 90 degrees out of phase relative to the
25 phase of illumination pattern. These information components are used in the creation of the mathematical synthetic image. As will be explained in the following sections, there are other useful images that may be created by extracting the amplitude and phase of the optical image.

Three dimensional imaging: The periodic illumination scanning in one axis, is a process in which the object is illuminated with energy, or amplitude, or other physical quality that is significant to the measurement, having a space distribution function at the focal plane $L(x,t)$ which is a good approximation at the range of interest to:

$$(25) \quad L(x,t) = A_0 + A_1 \cos (2\pi x/\delta + \psi(t)) \\ + A_2 \cos (4\pi x/\delta + 2\psi(t)) + \dots$$

$L(x,t)$ is a periodic function, with period equal to δ . The axis x coincides with the periodic axis of L . The function in L in equation (25) is written as a series of harmonics with spatial frequencies $0, 1/\delta, 2/\delta, 3/\delta, \dots$. The scanning is enabled by changing the phase $\psi(t)$.

We will consider the illumination pattern to be tilted, if within the depth of focus, the space distribution function $L(x,z,t)$ is a good approximation in the range of interest to:

$$(26) \quad L(x,z,t) = A_0 + A_1 \cos (2\pi x/\delta + \psi(t) + \alpha z) + \dots$$

where α is constant, and $z=0$ at the focal plane. If $\alpha=0$, we will consider the illumination pattern to be non-tilted. A_1 may also be a function of y or z , because the z -axis measures the distance from the focal plane, where the modulation is greatest. A drop in the modulation will cause A_0 to increase, while all the other coefficients will decrease.

A point of the object at location (x,y,z) within the focal depth of the imaging system, will be illuminated by a periodic pattern with a phase dependent on its x and z . Knowing the (x,y) location of the point, for example, by observing the two dimensional image of the object, it is possible to analyze the height of the point on z -axis by extracting the phase αz .

Measurement of the phase αz in (26) can be done qualitatively by observation of the lines of illumination in a static mode, where $L(x,z)$ is time-independent. The lines will create a meshing over the object, the shape of the meshing effect being a function of the topology of the object.

A more accurate measure is enabled by shifting the phase $\psi(t)$. For example, we may consider a constant rate of phase shift, ω , so equation (26) will have the form of:

$$(27) \quad L(x,z,t) = A_0 + A_1 \cos (2\pi x/\delta + \omega t + \alpha z) + \dots$$

5 The image of the object illuminated by such a pattern will have the form of:

$$(28) \quad I(x,y,t) = B_0(x,y) + B_1(x,y) \cos (2\pi x/\delta + \omega t + \alpha z + \phi(x,y)) + \dots$$

In equation (28), the axes x,y are the equivalent axes to the axes x,y 10 in the object plain, imaged to the image plane. It is possible to evaluate both amplitude $B_1(x,y)$, and the phase $[2\pi x/\delta + \alpha z + \phi(x,y)]$ at any desired point in (x,y) by means of Fourier transformation in time domain. The phase measured at the image plain contains the useful component, αz , from which the height z may be measured, plus an additional phase $\phi(x,y)$, 15 which limits the accuracy of the measurement of z . The additional phase $\phi(x,y)$ has a high value at high spatial frequencies, and a low value at low spatial frequencies. The third component in the evaluated phase is $2\pi x/\delta$. This component is known for a known point location x , and known period δ .

20 The Fourier time domain transformation does not necessarily require a constant rate of phase shifting, ψ . It is possible to extract the same information through a sequence of images resulting from phase shifting in discrete steps.

Thus, it is possible to evaluate three dimensional information of an object, 25 by illuminating the object with a tilted periodic pattern, and creating synthetic images by measuring the phase and amplitude at the optical image plain. The images created by measuring phase and amplitude at the image plane, may also be useful for the non-tilted illumination pattern.

For example, if the object contains a unique, adjacent point, which 30 interacts with the illumination, the phase information which includes the

component $2\pi x/\delta$ will yield the exact location of the point of interest on the x axis. The example given here is with illumination pattern periodic in one axis, x. The method can be used for an illumination pattern which is periodic in a different axis or which is periodic in two axes.

- 5 The case of the periodic illumination in two axes, x and y, is a simple continuation of the case of a periodic pattern in one axis, x. The same method for three dimensional imaging using a periodic illumination pattern in a single axis, x, can be applied in both axes, x and y.

 The method of imaging an object using a periodic illumination
10 pattern may yield information of a thin slice **within** a thick volume. Only the thin slice, which is in the depth of focus of the microscope and the optical system which produces the illumination pattern, can contribute to the image. The three dimensional imaging of a thick volume is enabled by creating a sequence of thin slice images. In the case of a non-tilted
15 periodic illumination pattern, the vertical resolution is equal to the thickness of the slices. A tilted illumination pattern may be used to provide a better vertical resolution.

Automatic Focussing

 The periodic pattern illumination is also very useful for focussing
20 the optical system. The periodic illumination pattern is a uniform illumination modulated by a periodic pattern. The periodic pattern creates a modulation over the illuminated object with the spatial frequency of the basic period of the pattern and its higher harmonics. If the observed object is in the focal plane of the microscope and the illumination, the
25 optical image of the object will also appear to be modulated with the same spatial frequency. If the object is out of focus, modulation of the illumination will decrease. Therefore, measuring the amplitude of the modulation frequency over the optical image can verify that there is an object within the focal range of the microscope and the illumination

system, and can help to optimize adjustment of the position of the focal plane for better imaging of the object. The focal range contains the object plane of the microscope and a certain range below and above the object plain, so that any object within that range may create a sharp optical image
5 modulated by the periodic illumination pattern. The range of sharp optical image is the depth-of-field of the microscope.

Fourier transformation of the optical image at a certain range of interest will yield the amplitude of the modulating spatial frequency. Depending on the optical configuration and the interaction of the
10 illumination with the object, high or low amplitude will indicate that the imaging system is in focus. If the optical image is created by light transmitted through the object, low amplitude of the modulating frequency will indicate that there is an interaction of the periodic illumination pattern with the object. If there is no interaction at the object plane, then the
15 illumination pattern will be transmitted without any interference, therefore the amplitude of the modulation frequency will be high. In contrast, if the interaction of the periodic illumination pattern with the object is by reflection, then a high amplitude of the modulating frequency at the image plane will indicate that there is an object within the focal range which
20 reflects some of the illumination. Other types of interactions, such as fluorescence, will also yield a high amplitude of the modulating frequency. Therefore, it is possible to identify an interaction of the illumination with the object at the focal range of a microscope by illuminating an object with a periodic illumination pattern, and by measuring the amplitude of the
25 modulating frequency at the area of interest on the optical image.

It is also possible to optimize the focus of the imaging microscope by measuring the amplitude of the modulation frequency while varying the focal range of the microscope, then finding the range at which the interaction of illumination with the object is the greatest. Depending on

the type of interaction, the highest or lowest amplitude of the modulation frequency will correspond to the greatest interaction.

Illumination of the object with a periodic illumination pattern creates spatial modulation with the basic frequency of the period. One
5 may also create temporal modulation by varying the phase of the pattern. For example, if we illuminate an object with the periodic pattern of equation (27), we may identify a spatial modulation with the spatial modulation frequency $1/\delta$, and may also identify a temporal modulation with temporal modulation frequency $\omega/2\pi$. Higher harmonics of these
10 frequencies may also modulate the optical image. Measurement of the modulation of the optical image can be done either in space domain or in time domain. In space domain, the modulation will be measured by analyzing the amplitude of the spatial modulating frequency in space domain at the area of interest of the optical image. The amplitude of the
15 modulation at a certain frequency is obtained from the Fourier transformation of the optical image at that frequency. In time domain, the modulation will be measured by analyzing the amplitude of the temporal modulation frequency in time domain at any point or an area of the optical image.

20 In equation (27), the phase of the periodic illumination pattern is varied continuously at a constant rate ω . The phase could also be varied in discrete steps rather than continuously. In certain cases, varying the phase from zero to 2π is rather complicated and a smaller range of phase variations is desired (for example, in the case that the phase is shifted by
25 mechanically moving a source pattern). In that case, it is possible to vary the phase of the periodic illumination pattern harmonically at a certain frequency, f , in time. For a periodic illumination in one axis of equation (26), illumination with harmonic phase variation will have a space and time distribution function which is a good approximation at the range of
30 interest to $L(x,t)$:

$$(29) \quad L(x,t) = A_0 + A_1 \cos(2\pi x/\delta + a_m \cos(2\pi f t)) + \dots,$$

where f is the phase modulation frequency in time domain.

Assuming the phase variations are small, so that $a_m \ll 2\pi$, the modulation in time domain may be measured by analyzing the amplitude of the phase modulation frequency, f , in time domain, at any point or area of the optical image. The amplitude of the phase modulation frequency, f , in time domain is defined by the Fourier transformation in time domain at the same frequency. The example given here is with illumination pattern periodic in one axis x . The method can be used for illumination pattern periodic in a different axis or periodic in two axes.

The method of focussing the optical microscope using the periodic pattern illumination may also be used to couple the microscope to another optical imaging system. One way to produce the illumination pattern is by providing a source pattern and projecting its image on the object. The optical system that projects the illumination pattern on the object should be coupled to the optical microscope that produces the optical image, so the image plane of the first system (projection system) will coincide with the object plane of the other system (microscope). If the two systems do not share the same objective lens, then an adjustment will be required to couple them together. For example, if the optical system which projects the illumination pattern is an optical microscope having its own microscope objective, then the coupling to the imaging microscope will be enabled by adjusting the distance between the two objectives. A method for coupling the two optical systems is provided by projecting a periodic illumination pattern with one system while imaging the pattern with the other, and adjusting the image plane of one system to the object plane of the other to produce the sharpest optical image. The sharpness of the optical image of the periodic pattern can be measured either by measuring the amplitude of the modulation frequency in time domain or by measuring



the amplitude of the modulation frequency in time domain. These measurements were part of the focussing method explained before.

Implementation

Construction of the physical hardware and provision of the software
5 necessary to implement the method of the present invention, will be within
the understanding and ability of skilled artisans in the field. A symbolic
representation of a physical optical microscope system, 40, according to
the present invention is shown in Figure 4. Periodic illumination, 41, is
provided by any appropriate illumination source, as described above. For
10 example, the combination of light source, 12, and grating, 14, of Figure
2, with motor, 26, moving grating, 14, may be used. In the illustration
of Figure 4, the periodic illumination pattern is periodic in the x direction.
The x, y, and z axes shown are orthogonal axes in three-space. The
physical interaction of the periodic illumination with the object, 22, may
15 be any of a wide variety of interactions. These include reflection, as
shown for the purpose of illustration, in Figure 4. Imaging, 42, is
provided by any appropriate imaging system, such as an optical
microscope with a photodetector device, to develop an electronic
representation "optical image". The optical image provided by the
20 imaging system is processed by any appropriate processor, such as an
electronic digital computer. Processing, 48, of the optical image,
produces at least one synthetic image, 50. The synthetic images are the
result of processing according to the methods of the present invention,
using the unique combination of hardware, including periodic illumination,
25 and software, called for by the method of the present invention. The
processing, 48, consists of mathematically operating on the optical image
to produce at least one synthetic image, 50.

While the invention has been described with respect to a limited number of embodiments, it will be appreciated that many variations, modifications and other applications of the invention may be made. For example, in the implementation of Figure 2, lens, 20, may be a microscope objective, and lens, 16, may be a tube lens. It is possible that lenses 16 and 26 may be omitted, and a single lens or set of lenses, 20, will both project the illumination pattern and image the object. While lenses 16, 20, and 26, are illustrated as simple lenses, in general, they may represent complex lenses or lens systems.

10 A tilted illumination pattern may be implemented by collimating the beam illuminating the grating, 14, and tilting the collimated beam with respect to the optical axis of the lenses, 16 and 20. If the collimated beam is parallel to the optical axis, then the illumination pattern will be non-tilted.

15 While the invention has been described with respect to a limited number of embodiments, it will be appreciated that many variations, modifications and other applications of the invention may be made.

While the above discussion of the present invention is expressed in terms of a microscope, which is an optical imaging system which produces
20 a magnified optical image of an object, the invention is not limited only to use with microscopes. Rather, the present invention applies to any optical imaging system for which the periodic pattern illumination can be used.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of improving the resolution of imaging systems, for imaging an object, comprising the steps of:
 - illuminating the object with a periodic pattern;
 - scanning the object with said periodic pattern whereby the phase of said periodic pattern is varied;
 - receiving a plurality of images, representing said periodic pattern illuminating the object, said images corresponding to variations in the phase of said periodic pattern; and,
 - producing synthetic images by processing said plurality of images to extract information in phase with said periodic pattern and information 90 degrees out of phase with said periodic pattern.
2. A method of improving the resolution of imaging systems, for imaging an object, comprising the steps of:
 - illuminating the object with a periodic pattern;
 - scanning the object with said periodic pattern in one dimension whereby the phase of said periodic pattern is varied;
 - receiving a plurality of images, representing said periodic pattern illuminating the object, said images corresponding to variations in the phase of said periodic pattern; and,
 - processing said plurality of images to extract synthetic images S_1 and S_2 .
3. The method of claim 2, wherein the phase of said periodic pattern is varied continuously.

4. The method of claim 2, wherein the phase of said periodic pattern is varied in discrete steps.

5. A method of improving the resolution of imaging systems, for imaging an object, comprising the steps of:

illuminating the object with a periodic pattern;

scanning the object with said periodic pattern in one dimension

whereby the phase of said periodic pattern is varied;

receiving a plurality of images, representing said periodic pattern

illuminating the object, said images corresponding to variations in the phase of said periodic pattern; and,

producing at least one synthetic image by processing said plurality of images to extract at least one information selected from the group consisting of

(a) information in phase with said periodic pattern and information 90 degrees out of phase with said periodic pattern,

(b) information exclusively in phase with said periodic pattern, and

(c) information exclusively 90 degrees out of phase with said periodic pattern.

6. A method of improving the resolution of imaging systems, for imaging an object, comprising the steps of:

illuminating the object with a pattern periodic in two dimensions;

scanning the object with said periodic pattern in two dimensions,

whereby the phases of said periodic pattern are varied;

receiving a plurality of images, representing said periodic pattern

illuminating the object, said images corresponding to variations in the phases of said periodic pattern; and,

processing said plurality of images to extract synthetic images S_1 , S_2 , S_3 and S_4 .

7. A method of improving the resolution of imaging systems, for imaging an object, comprising the steps of:

illuminating the object with a pattern periodic in two dimensions, along an x-axis and a y-axis;

scanning the object with said periodic pattern in two dimensions, whereby the x-axis and y-axis phases, of said periodic pattern are varied;

receiving a plurality of images, representing said periodic pattern illuminating the object, said images corresponding to variations in the phases of said periodic pattern; and,

producing at least one synthetic image by processing said plurality of images to extract at least one information selected from the group consisting of

(a) information in phase with the x-axis illuminating pattern and in phase with the y-axis illuminating pattern,

(b) information 90 degrees out of phase with the x-axis illuminating pattern and 90 degrees out of phase with the y-axis illuminating pattern,

(c) information in phase with the x-axis illuminating pattern and 90 degrees out of phase with the y-axis illuminating pattern, and

(d) information 90 degrees out of phase with the x-axis illuminating pattern and in phase with the y-axis illuminating pattern.

8. An apparatus for enhancing the resolution of an imaging system, for imaging an object, comprising:

an energy source;

periodic means for producing an illuminating periodic pattern in one dimension from said energy, said periodic means movable in one dimension whereby the phase of said periodic pattern may be varied in one dimension;

first imaging system for passing said periodic pattern from said periodic means through to the object whereby the object interacts with said periodic pattern;

second imaging system coupled to said first imaging means, said second imaging system for converting energy resulting from interaction between the object and said periodic pattern into an electrical signal, said electrical signal representing images of said energy resulting from interaction between the object and said periodic pattern; and,

processor coupled to said periodic means and said second imaging system, said processor for controlling said periodic means in one dimension, said processor for extracting information in phase with said periodic pattern and information 90 degrees out of phase with said periodic pattern.

9. The apparatus of claim 8, wherein said periodic means includes a grating.

10. The apparatus of claim 8, wherein said processing means causes said periodic means to move continuously whereby the phase of the illuminating periodic pattern falling on the object is varied continuously.

11. The apparatus of claim 8, wherein said processing means causes said periodic means to move in discrete steps whereby the phase of the illuminating periodic pattern falling on the object is varied in discrete steps.

12. An apparatus for enhancing the resolution of an imaging system, for imaging an object, comprising:

an energy source;

periodic means for producing an illuminating pattern periodic in two dimensions from said energy, said periodic means movable in two dimensions whereby the phases of said periodic pattern may be varied in two dimensions;

first imaging system for passing said periodic pattern from said periodic means through to the object whereby the object interacts with said periodic pattern;

second imaging system for converting energy resulting from interaction between the object and said periodic pattern into an electrical signal, said electrical signal representing images of energy resulting from interaction between the object and said periodic pattern; and,

a processor coupled to said periodic means and said second imaging system, said processor for controlling said periodic means in two dimensions, said processor for extracting two dimensional information in phase with said periodic pattern and two dimensional information 90 degrees out of phase with said periodic pattern.

13. The apparatus of claim 12, wherein said periodic means includes two gratings oriented 90 degrees apart.

14. The apparatus of claim 12, wherein said processor causes said periodic means to move continuously whereby the phase of the illuminating periodic pattern falling on the object is varied continuously.

15. The apparatus of claim 12, wherein said processor causes said periodic means to move in discrete steps whereby the phase of the illuminating periodic pattern falling on the object is varied in discrete steps.

16. A method for producing a synthetic image of an object comprising the steps of;

- (a) illuminating the object with a periodic illumination pattern whereby the object interacts with said periodic illumination pattern;
- (b) scanning the object with said periodic illumination pattern whereby the phase of said periodic illumination pattern is varied;
- (c) providing an optical microscope for imaging said interaction of the object with said periodic illumination pattern, said imaging thereby producing optical images, said optical images representing said interaction of the object with said periodic illumination pattern;
- (d) producing a plurality of said optical images with said optical microscope;
- (e) providing a processor for mathematically processing said optical images to produce a synthetic image; and,
- (f) processing said optical images with said processor to produce a synthetic image.

17. The method of claim 16, wherein said periodic illumination pattern is tilted.

18. The method of claim 16, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is scattering.

19. The method of claim 16, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is reflection.

20. The method of claim 16, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is transmission.

21. The method of claim 16, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is phase shifting.

22. The method of claim 16, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is absorption.

23. The method of claim 16, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is fluorescence.

24. The method of claim 16, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is depolarization.

25. The method of claim 16, wherein said processing to produce said synthetic image includes extracting information in phase with said periodic illumination pattern.

26. The method of claim 16, wherein said processing to produce said synthetic image includes extracting information 90 degrees out of phase with said periodic illumination pattern.

27. The method of claim 16, wherein said processing to produce said synthetic image includes measuring the phase of said optical image at the image plane.

28. The method of claim 16, wherein said processing to produce said synthetic image includes measuring the amplitude of said optical image at the image plane.

29. The method of claim 16, wherein said periodic illumination pattern is an image of a source pattern which has a periodic structure.

30. The method of claim 29, wherein said source pattern is an electronically controlled spatial filter.

31. The method of claim 29, wherein said source pattern is an electronically controlled light source.

32. The method of claim 16, wherein said periodic illumination pattern is an interference pattern of a plurality of coherent beams, thereby providing a coherent interference pattern.

33. A method for producing three-dimensional information of a thick volume comprising the steps of;

(a) individually illuminating thin slices of the thick volume with a periodic illumination pattern whereby each said slice interacts with said periodic illumination pattern;

(b) scanning each said slice with said periodic illumination pattern whereby the phase of said periodic illumination pattern of each said slice is varied;

(c) providing an optical microscope for imaging said interaction of each said slice with said periodic illumination pattern, said imaging thereby producing optical images, said optical images representing said interaction of each said slice with said periodic illumination pattern;

(d) producing a plurality of said optical images of each said slice with said optical microscope;

(e) providing a processor for mathematically processing said optical images of each said slice to produce synthetic images; and,

(f) processing said optical images with said processor to produce a synthetic image of each said slice.

34. The method of claim 33, wherein said periodic illumination pattern is tilted.

35. A method for producing a synthetic image of an object comprising the steps of;

(a) illuminating the object with a periodic illumination pattern which is periodic in two dimensions, whereby the object interacts with said periodic illumination pattern;

(b) scanning the object in two axes with said periodic illumination pattern whereby the phase of said periodic illumination pattern is varied in said two axes;

(c) providing an optical microscope for imaging said interaction of the object with said periodic illumination pattern, said imaging thereby producing optical images, said optical images representing said interaction of the object with said periodic illumination pattern;

(d) producing a plurality of said optical images with said optical microscope;

(e) providing a processor for mathematically processing said optical images to produce a synthetic image; and,

(f) processing said optical images with said processor to produce a synthetic image.

36. The method of claim 35, wherein said periodic illumination pattern is tilted.

37. The method of claim 35, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is scattering.

38. The method of claim 35, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is reflection.

39. The method of claim 35, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is transmission.

40. The method of claim 35, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is phase shifting.

41. The method of claim 35, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is absorption.

42. The method of claim 35, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is fluorescence.

43. The method of claim 35, wherein said interaction of said periodic illumination pattern with the object is depolarization.

44. The method of claim 35, wherein said processing to produce said synthetic image includes extracting information in phase with said periodic illumination pattern in both said axes.

45. The method of claim 35, wherein said processing to produce said synthetic image includes extracting information 90 degrees out of phase with said periodic illumination pattern in both axes.

46. The method of claim 35, wherein said processing to produce said synthetic image includes extracting information in phase with said periodic illumination pattern in one said axis and 90 degrees out of phase with said periodic illumination pattern in the second axis.

47. The method of claim 35, wherein said processing to produce said synthetic image includes measuring the phase of said optical image at the image plane.

48. The method of claim 35, wherein said processing to produce said synthetic image includes measuring the amplitude of said optical image at the image plane.

49. The method of claim 35, wherein said periodic illumination pattern is an image of a source pattern which has a periodic structure.

50. The method of claim 49, wherein said source pattern is an electronically controlled spatial filter.

51. The method of claim 49, wherein said source pattern is an electronically controlled light source.

52. The method of claim 35, wherein said periodic illumination pattern is an interference pattern of a plurality of coherent beams, thereby providing a coherent interference pattern.

53. A method of identifying the interaction of a periodic illumination pattern with an object within the focal range of a microscope, comprising the steps of:

(a) producing illumination having a periodic illumination pattern within the focal range of the microscope;

(b) imaging the object within the focal range with the microscope to produce an optical image, whereby the periodic pattern of the illumination modulates the optical image in space domain; and,

(c) measuring the amplitude of the modulation frequency in space domain within an area of interest of the optical image.

54. A method of identifying the interaction of a periodic illumination pattern with an object within the focal range of a microscope, comprising the steps of:

(a) producing illumination having a periodic illumination pattern in space domain within the focal range of the microscope;

(b) varying, in time, in a periodic manner, the phase of the periodic illumination pattern, thereby providing a periodic illumination both in space domain and in time domain;

(c) imaging the object within the focal range with the microscope to produce an optical image, whereby the periodic pattern of the illumination modulates the optical image in both space domain and in time domain; and

(d) measuring the amplitude of the modulation frequency in time domain within an area of interest of the optical image.

55. A method of focussing a microscope, comprising the steps of:

(a) producing illumination having a periodic illumination pattern within the focal range of the microscope;

(b) imaging the object within the focal range with the microscope to produce an optical image, whereby the periodic pattern of the illumination modulates the optical image in space domain; and

(c) measuring the amplitude of the modulation frequency in space domain within an area of interest of the optical image;

(d) varying the focal range of the microscope; and

(e) finding the focal range of the microscope at which the interaction of an object with said periodic illumination pattern is greatest.

56. A method of focussing a microscope, comprising the steps of:

(a) producing illumination having a periodic illumination pattern in space domain within the focal range of the microscope;

(b) varying, in time, in a periodic manner, the phase of the periodic illumination pattern, thereby providing a periodic illumination both in space domain and in time domain;

(c) imaging the object within the focal range with the microscope to produce an optical image, whereby the periodic pattern of the illumination modulates the optical image in both space domain and in time domain;

(d) measuring the amplitude of the modulation frequency in time domain within an area of interest of the optical image;

(e) varying the focal range of the microscope; and

(f) finding the focal range of the microscope at which the interaction of an object with said periodic illumination pattern is greatest.

57. A method of coupling a microscope to a second optical imaging system, comprising the steps of:

(a) projecting a periodic illumination pattern with the second optical imaging system onto the image plane of the second optical imaging system;

(b) imaging said periodic illumination pattern with the microscope to produce an optical image, whereby the periodic pattern of the illumination modulates the optical image in space domain; and

(c) measuring the amplitude of the modulation frequency in space domain within an area of interest of the optical image;

(d) varying the location of the said image plain of the said optical imaging system with respect to the said object plain of the said microscope, and

(e) finding the location of the said image plain of the said optical imaging system with respect to the said object plain of the said microscope, at which the amplitude of the modulating frequency in space domain, at the area of interest of the optical image, is highest.

58. A method of coupling a microscope to a second optical imaging system, comprising the steps of:

(a) producing illumination having a periodic illumination pattern in space domain within the focal range of the microscope;

(b) varying, in time, in a periodic manner, the phase of the periodic illumination pattern, thereby providing a periodic illumination both in space domain and in time domain;

(c) imaging said periodic illumination pattern with the microscope to produce an optical image, whereby the periodic pattern of the illumination modulates the optical image in both space domain and in time domain;

(d) measuring the amplitude of the modulation frequency in time domain within an area of interest of the optical image;

(e) varying the position of the image plain of the optical imaging system with respect to the object plain of the microscope; and,

(f) finding the position of the image plain of the optical imaging system with respect to the object plain of the microscope, at which the amplitude of the modulating frequency in time domain, at the area of interest of the optical image, is highest.

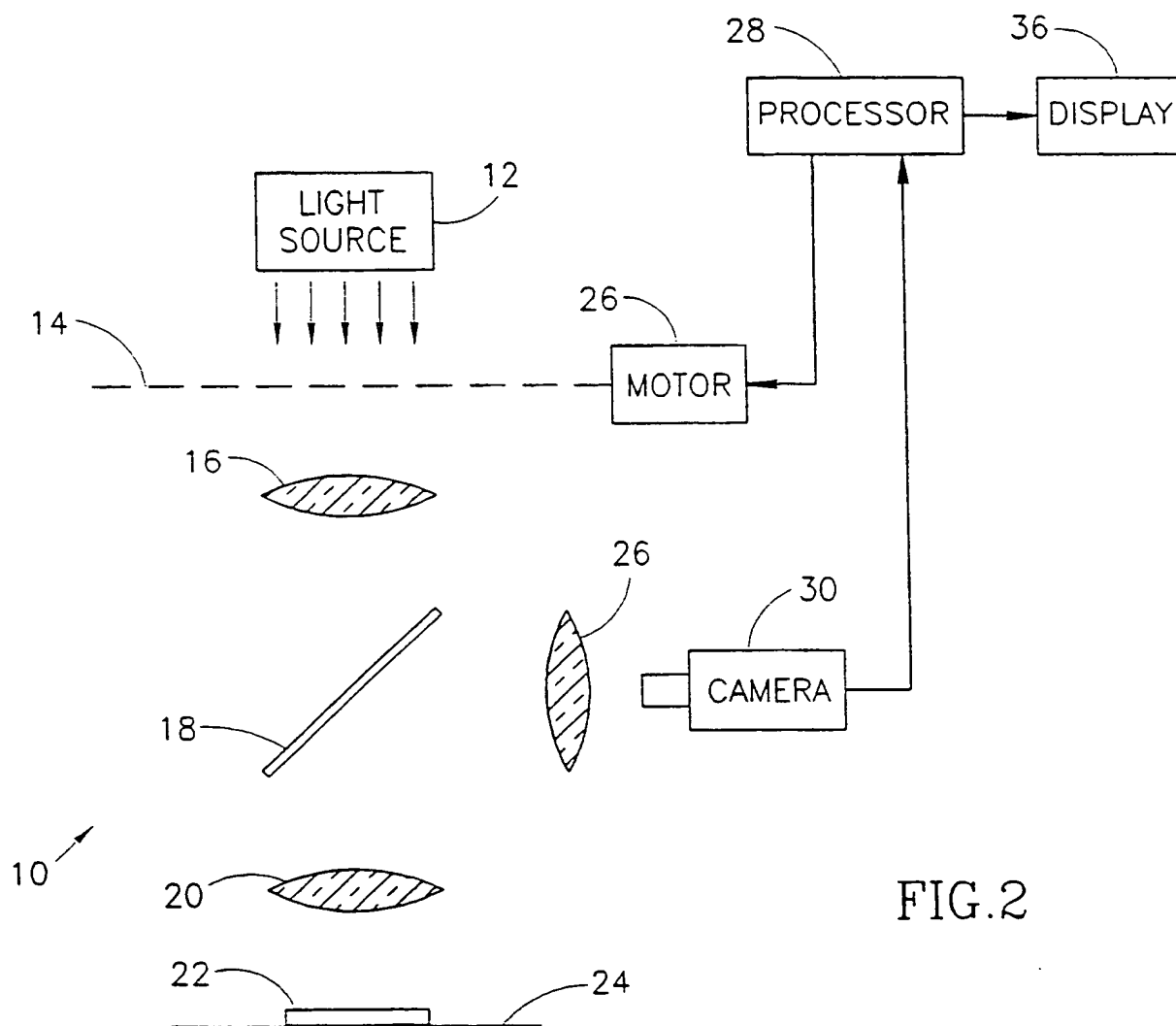
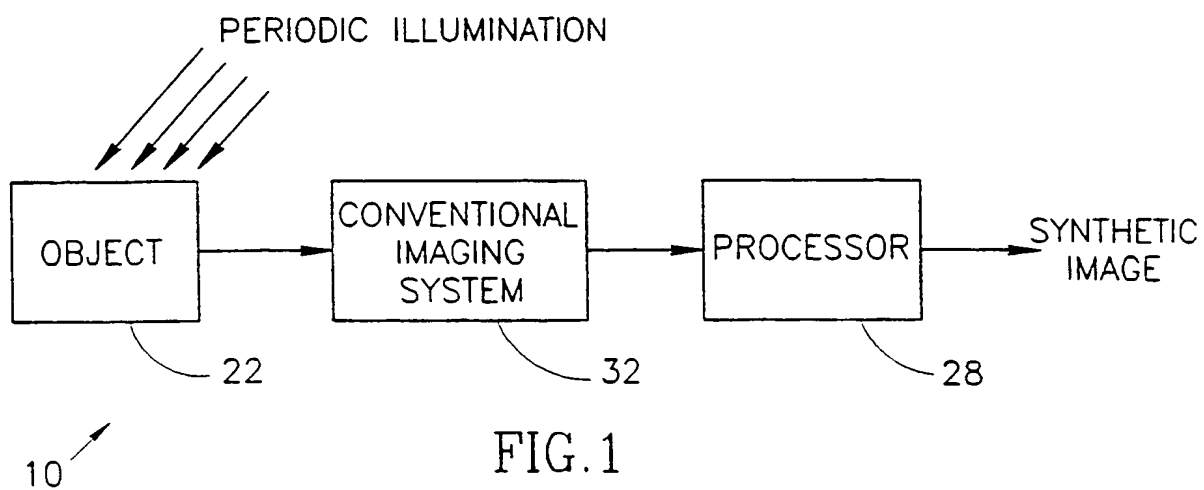
59. A method for three-dimensional imaging of an object, comprising the steps of:

(a) illuminating the object with a tilted periodic illumination pattern, whereby said tilted illumination pattern creates a meshing effect

over the object, the shape of said meshing effect being a function of the topology of the object;

- (b) providing a microscope for imaging the object;
- (c) imaging the object to produce an optical image.

1/3



2/3

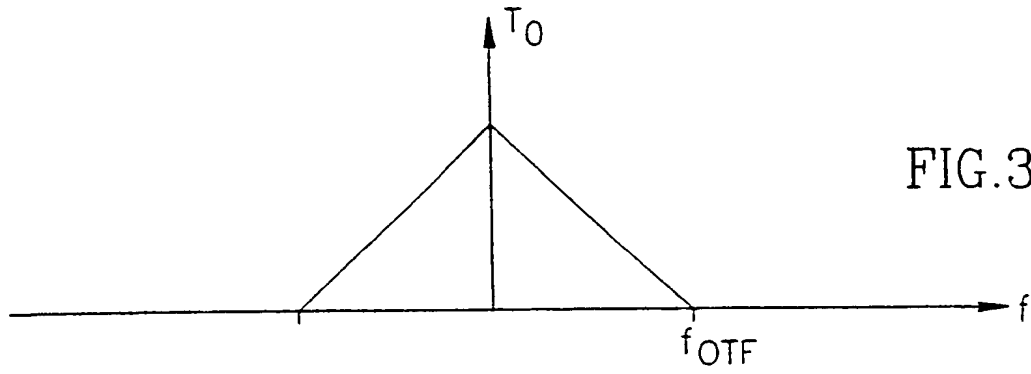


FIG. 3A

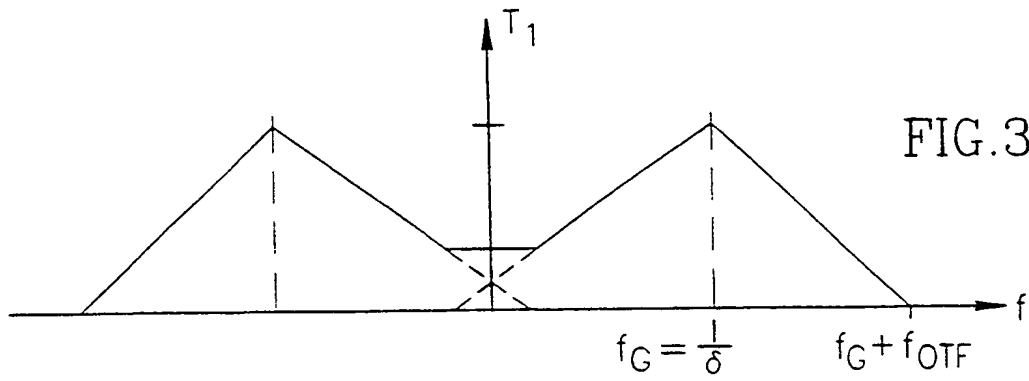


FIG. 3B

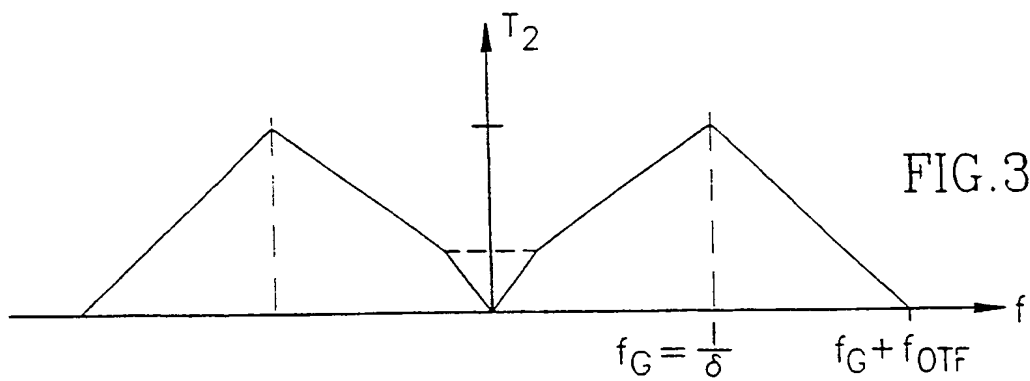


FIG. 3C

3/3

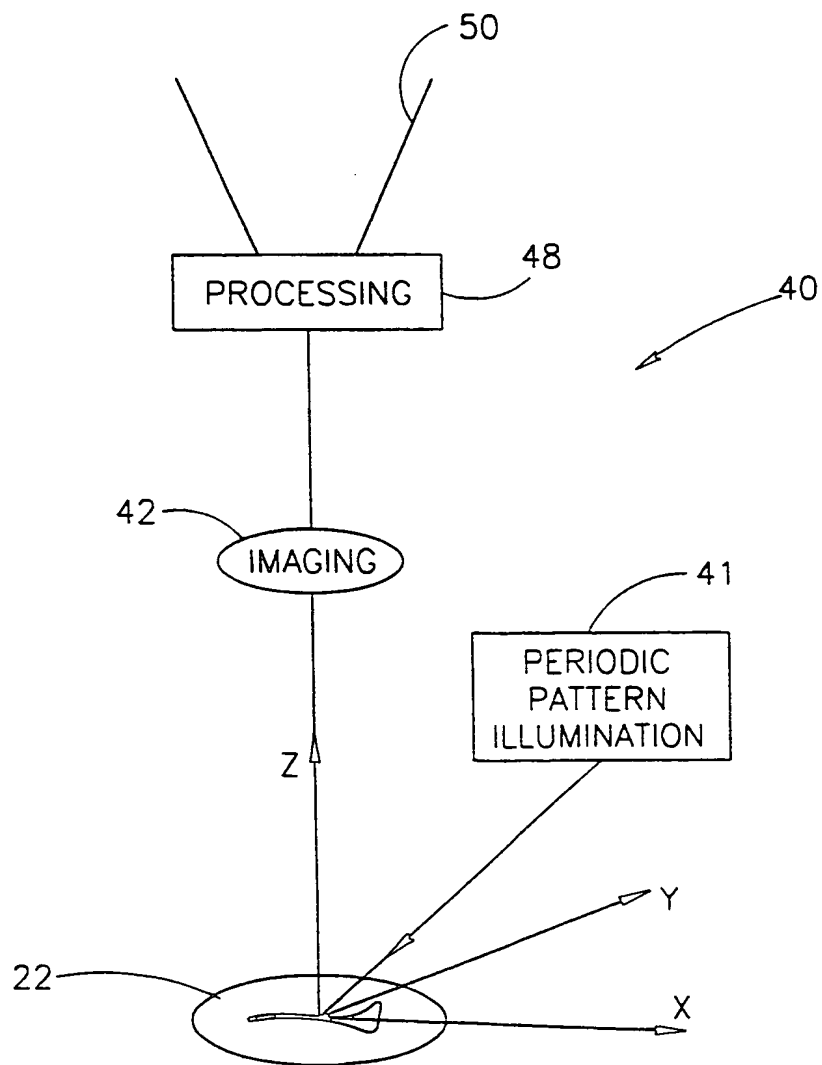


FIG.4

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) :G06T 5/00

US CL :382/254; 356/376

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 382/254, 299, 276; 356/376, 387

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, STN, ProQuest IEEE

search terms: periodic, phase, increasing bandwidth

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,212,073 (BALASUBRAMANIAN) 08 July 1980, col.2, lines 24-43	1-59
Y	US, A, 4,844,617 (KELDERMAN ET AL.) 04 July 1989, abstract	53-59
Y	US, A, 4,929,951 (SMALL) 29 May 1990, col.2, lines 7-68, col.3, lines 1-19	1-59
Y	US, A, 5,146,293 (MERCER ET AL.) 08 September 1992, col.2, lines 41-68	1-15, 26, 45-46,
Y	US, A, 5,381,236 (MORGAN) 10 January 1995, col.1, lines 55-68, col.2, lines 1-12	55-56
Y,P	US, A, 5,471,307 (KOLIOPOULOS ET AL.) 28 November 1995, col.3, lines 53-68, col.7, lines 44-58, col.8, lines 25-	1-59



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
A document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
E earlier document published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*G* document member of the same patent family
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

25 SEPTEMBER 1996

Date of mailing of the international search report

16 OCT 1996

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
JON CHANG

Telephone No. (703) 305-8439

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/12276

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, A, 4,164,788 (JAIN) 14 August 1979, abstract	1-59
A	US, A, 5,156,943 (WHITNEY) 20 October 1992, abstract	1-59

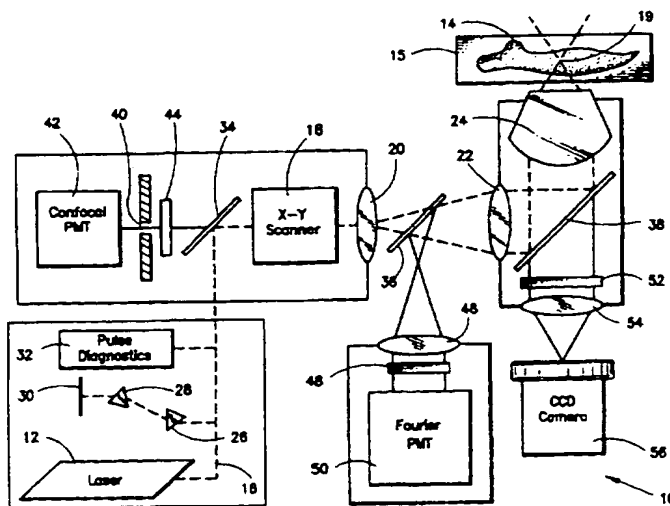
Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)*



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : G01N 21/64		A1	(11) International Publication Number: WO 97/11355
			(43) International Publication Date: 27 March 1997 (27.03.97)
(21) International Application Number: PCT/US96/14519 (22) International Filing Date: 18 September 1996 (18.09.96) (30) Priority Data: 60/003,957 19 September 1995 (19.09.95) US (71) Applicant (for all designated States except US): CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC. [US/US]; 20 Thornwood Drive, Ithaca, NY 14850 (US). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): WEBB, Watt, W. [US/US]; 9 Parkway Place, Ithaca, NY 14850 (US). XU, Chris [CN/US]; 2203 Hasbrouck Apartment, Ithaca, NY 14850 (US). (74) Agents: BLAKE, William, A. et al.; Jones, Tullar & Cooper, P.C., Suite 1002, 2001 Jefferson Davis Highway, Arlington, VA 22202 (US).			(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published With international search report.

(54) Title: MULTI-PHOTON LASER MICROSCOPY



(57) Abstract

A laser scanning microscope (10) produces molecular excitation in a target material (14) by simultaneous absorption of three or more photons to thereby provide intrinsic three-dimensional resolution. Fluorophores having single photon absorption in the short (ultraviolet or visible) wavelength range are excited by a beam (16) of strongly focused subpicosecond pulses of laser light of relatively long (red or infrared) wavelength range. The fluorophores absorb at about one third, one fourth or even smaller fraction of the laser wavelength to produce fluorescent images of living cells and other microscopic objects. The fluorescent emission from the fluorophores increases cubically, quartically or even higher power law with the excitation intensity so that by focusing the laser light, fluorescence as well as photobleaching are confined to the vicinity of the focal plane. This feature provides depth of field resolution comparable to that produced by confocal laser scanning microscopes, and in addition reduces photobleaching and phototoxicity.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

MULTI-PHOTON LASER MICROSCOPYBackground Of The Invention

The present invention relates to a laser microscopy technique which produces molecular excitation in a target material by simultaneous absorption of three or more photons. The invention is an improvement over the two-photon laser microscopy technique disclosed in U.S. Patent No. 5,034,613 to Denk et al. (hereinafter, the '613 patent), and this patent is hereby incorporated by reference.

The '613 patent discloses a laser scanning microscope which produces molecular excitation in a target material by simultaneous absorption of two photons to provide intrinsic three-dimensional resolution. Fluorophores having single photon absorption in the short (ultraviolet or visible) wavelength range are excited by a stream of strongly focused subpicosecond pulses of laser light of relatively long (red or infrared) wavelength range. The fluorophores absorb at about one half the laser wavelength to produce fluorescent images of living cells and other microscopic objects. The fluorescent emission from the fluorophores increases quadratically with the excitation intensity so that by focusing the laser light, fluorescence and photobleaching are confined to the vicinity of the focal plane. This feature provides depth of field resolution comparable to that produced by confocal laser scanning microscopes, and in addition reduces photobleaching. Scanning of the laser beam, by a laser scanning microscope, allows construction of images by collecting two-photon excited

fluorescence from each point in the scanned object while still satisfying the requirement for very high excitation intensity obtained by focusing the laser beam and by pulse time compressing the beam.

5 The focused pulses also provide three-dimensional spatially resolved photochemistry which is particularly useful in photolytic release of caged effector molecules.

10 A drawback to the two-photon laser microscopy technique disclosed in the '613 patent is that its applications are limited by the available laser technology. In particular, the two-photon technique requires use of a laser at specific wavelengths, depending upon the application, so
15 that the sum of energy levels of the two photons provides the specific energy level needed to generate the desired fluorescent emission. Unfortunately, some laser microscopy applications would require use of a laser having a wavelength
20 which is not technologically feasible at the present time. For example, excitation of chromophores that have very short wavelength absorption, such as amino acids and nucleic acids, would require a laser having a 540 nm wavelength
25 using the two-photon technique, and such a laser does not exist at the present time.

Summary Of Invention

30 The present invention provides a solution to the aforementioned problem through the application of three or more photon excitation to laser scanning fluorescence microscopy and to spatially resolved photo-chemical processing, such as caged reagent activation for micropharmacology and

polymer cross linking for 3-d optical information storage.

Because three-photon induced fluorescence obeys a cubic dependence on excitation intensity and four photon excitation obeys a quartic dependence, both provide intrinsic three-dimensional resolution in laser scanning microscopy. Although such 3-d resolution has already been achieved by the nonlinear microscopy technique based on two-photon excitation disclosed in the '613 patent, three-photon excitation provides a unique opportunity to excite molecules normally excitable in the UV range (230-350 nm) with near IR light (700-1100 nm). Interesting biomolecules, such as the amino-acids tryptophan and tyrosine, the neurotransmitter serotonin and nucleic acids, have one-photon absorption peaks at approximately 260-280 nm, and fluorescence can be excited in these biomolecules by three and four photon excitation. The advantages of using long wavelength, near IR light are possibly less photodamage to living cells and conveniently available solid state femtosecond laser sources for deep UV absorbers. In practice, the configuration of three-photon laser scanning microscopy can be identical to the existing two-photon systems. However, because three-photon and two-photon absorption spectra are in general quite different, the combination of two- and three-photon excited fluorescence microscopy extends the useful range of the laser systems currently employed in two-photon microscopy.

A particularly advantageous application of three or more photon excitation is the replacement of excimer lasers for certain applications which

require absorption of wavelengths around 200 nm. Three and four photon excitation by lasers generating much longer wavelengths (say 550-900 nm) should provide similar energy absorption and provide 3-d spatial resolution as well. Because excimer lasers are extremely expensive and user unfriendly, several photon excitation could be highly desirable.

The practicality of the proposed three-photon microscopy depends crucially on the three-photon fluorescence excitation cross-sections of various fluorophores and biomolecules. However, very few three-photon absorption cross-sections have been reported. A simple calculation based on perturbation theory shows that three-photon excitation would typically need <10 times the peak intensity currently used with two-photon excitation technique to achieve a comparable level of excitation. This required intensity level can be easily accessed by femtosecond laser sources, such as the modelocked Ti:sapphire laser. Three-photon induced fluorescence of tryptophan and serotonin has been observed at excitation wavelengths between approximately 800 and 900 nm using a modelocked Ti:sapphire laser. The measured fluorescence obeys an expected cubic law dependence on excitation intensity. Measurements of fluorescence power of the calcium indicator dye Fura II at an excitation wavelength (approximately 911 nm) well below the expected three-photon excitation optimum, showed that satisfactory fluorescence images should be obtainable at only ~5 times the laser power required for two photon excitation of Fura II at its optimum excitation wavelength (approximately 730 nm). The estimated

three-photon fluorescence excitation cross-section from these preliminary results shows that three-photon laser scanning microscopy can be done with a reasonable level of excitation power. How
5 widely applicable this approach will be remains to be determined. Four-photon excitation may be limited by the onset of strong one-photon absorption by water above about 1000 nm.

Studies of molecular excitation of
10 fluorescence by three or more photon processes are rare because the excitation cross sections have been expected to be quite small. Thus, useful rates of excitation usually require very high instantaneous illumination intensities. A simple
15 extrapolation of multiphoton cross sections is suggested by the pattern of matrix elements products in the perturbation theory solutions of the quantum mechanics of the dipole transition probability for molecular excitation by a
20 radiation field. Basically, the multiphoton processes require three or more photons to interact with the molecule (within the cross sectional area of a molecule, $A \sim 10^{-16} \text{ cm}^2$) and simultaneously (within a time interval determined
25 by the life times of intermediate states, $\delta t \sim 10^{-16} \text{ s}$). This short coincidence time is limited by the large energy uncertainties introduced by the perturbation theory energy denominators.

Fluorescence excitation by several photons
30 does not significantly increase laser microscopy resolution because the longer excitation wavelength (for a given fluorophore) decreases resolution by about as much as it is increased by raising the one-photon point spread function to
35 the power n for several-photon processes. Were it

not for the wavelength factors, the increase in resolution of three photon excitation would be essentially the same as that incurred by adding an ideal confocal spatial filter to two photon microscopy.

Recent reports of unexpectedly large three-photon cross sections have been found in the course of research directed toward enhancing optical limiting absorption (which is intended to provide variable shades for protection of human vision from excessively brilliant light flashes). Recently, a three photon absorption cross section of about $10^{-75} \text{ cm}^6\text{s}^2$ has been reported for absorption and fluorescence of 2,5-benzothiazol-3,4-didecyloxy thiophene in tetrahydrofuran. Another recent experiment shows three photon excitation of fluorescence from a conjugated organic polymer. This process, however, appears to involve two excitation states unlike most fluorescence excitation. Although the conditions of these experiments are hardly suitable for laser scanning fluorescence microscopy or for most microphotochemistry, the large cross sections are promising. Note, however, that such large cross-sections are not essential for three or more photon microscopy.

The excitation wavelength dependence of the rate of photodamage to living cells during fluorescence microscopy and photomicropharmacology is largely unknown and may vary greatly for different applications. Empirical studies have shown that two-photon excitation elicits far less damage than one-photon excitation for comparable fluorescence image acquisition. It is not clear whether further improvement can be

made by stepping up to three- or four-photons for excitation. With the aid of such knowledge and the knowledge of the nonlinear absorption spectra, it is conceivable that the optimum excitation mode can be determined and utilized for each individual system in the future. A particularly appealing possibility is the use of one laser wavelength to induce photochemistry by three photon excitation and concurrently two-photon excitation of an accompanying fluorescence signal. Three-photon excitation seems quite likely to become a useful enhancement of the existing two-photon excitation technique but seems unlikely to replace it.

Alternatively, for microscopic photochemical activation, photoablation and optical surgery, the photo excitation can be advantageously accomplished by multi-photon excitation of intrinsic chromophores or even added chromophores that have very short wavelength absorption such as amino acids and nucleic acids. Multi-photon excitation allows the selection of more available lasers providing subpicosecond pulses at long wavelengths and long wavelength light transmission to the microscopic focal volume where photo excitation is desired.

Brief Description of the Drawings

The foregoing and additional features and advantages of the present invention will become apparent from the following detailed description of a preferred embodiment thereof, taken in conjunction with the accompanying drawings, in which:

FIG. 1 is a diagrammatic illustration of a laser scanning microscope utilized in accordance

with a preferred embodiment of the present invention; and

FIGs. 2 and 3 are graphs of the average fluorescence intensity versus the applied peak
5 laser flux density obtained utilizing three-photon excitation of Fura-2 and Indo-1, respectively.

Best Mode For Carrying Out The Invention

Turning now to a detailed description of a preferred embodiment of the present invention,
10 FIG. 1 illustrates in diagrammatic form a conventional laser scanning microscope 10 which includes three detection alternatives. A subpicosecond pulsed laser source 12 provides the necessary excitation of a specimen or target
15 material 14 which is positioned on a movable stage or other suitable support 15. The laser 12 may be, for example, a colliding pulse, mode-locked dye laser or a solid state laser which can generate pulses of light having a wavelength in
20 the red region of the spectrum, for example about 630 nm, with the pulses having less than 100 fsec duration at about 80 MHz repetition rate. Other bright pulsed lasers may also be used to produce light at different relatively long wavelengths in
25 the infrared or visible red region of the spectrum, for example, to generate the necessary excitation photon energies whose sum will equal the appropriate absorption energy band required by the fluorophores in the specimen. In a single
30 photon excitation technique, these would be excited by absorption of a single photon in the spectral region having wavelengths approximately one third or one fourth the wavelength of the incident light, for three and four photon

excitation, respectively. Thus, for example, three photons in the visible red region at 945 nm would combine to excite a fluorophore which normally absorbs light in the ultraviolet region at 315 nm, while three photons at 1070 nm would excite a molecule which absorbs at 357 nm in the visible light region.

In a modified form of the invention, the single wavelength laser 12 can be replaced by two or more different long wavelength laser sources so that the incident light beam consists of two or more superimposed pulsed light beams of high instantaneous power and of different wavelengths. The wavelengths of the incident beam are selected to excite a fluorophore which is absorbent at a short wavelength which may be described as:

$$1/\lambda_{\text{abs}} = 1/\lambda_1 + 1/\lambda_2 + 1/\lambda_3$$

where λ_{abs} is the short wavelength of the absorber, and λ_1 , λ_2 and λ_3 are the laser incident beam wavelengths for the three wavelength case.

The laser 12 generates a pulsed output beam 16 which is scanned by an X-Y scanner 18 comprising a set of oscillating mirrors, and is then focused onto the specimen 14 at a focal point or volume 19 therein by a pair of eyepiece lenses 20 and 22, and an objective lens 24. The objective lens' back aperture is a pivot point for the scanned beam so, neglecting aberrations, all points in the raster pattern experience equivalent imaging conditions. The scanner 18 causes scanning of the focal point or volume 19 through the material 14, thereby causing fluorescence excitation of the material 14 at or near the focal point or volume 19.

Before the output beam 16 is directed into the X-Y scanner 18, it undergoes both dispersion compensation and pulse diagnostics. One complication of femtosecond pulsed illumination is dispersion. Short pulses tend to be broadened when passing through optical materials because differing frequency components of the pulse band width travel at different speeds within the materials. Dispersion compensation for optical materials is not essential for pulses greater than about 120 fsec, as these pulses have a small frequency band width (about 4 nm) and thus experience little spreading. However, a 700 nm, 70 fsec pulse is found to be spread about 1.5 times by a good objective lens, and substantially more by standard acousto-optical modulators that may be used for beam modulation and shutters. Pulse broadening reduces the observed fluorescence proportionality. In the microscope 10, dispersion compensation for optical materials is effected by a double pass through a pair of glass prisms 26 and 28 that direct the light so that the higher (in general slower) frequencies travel through less glass and are thus restored to the appropriate phase lag. A totally reflecting mirror 30 is employed to provide the return pass through the prisms 26 and 28.

For quantitative measurements, it is necessary to know the wavelength and pulse duration of the excitation beam, and thus various forms of pulse diagnostics 32 are provided to analyze the pulsed output beam 16. For a rough monitor of both wavelength and duration, a simple monochromator which, in its standard configuration, provides wavelength measurement, is

sufficient. If the output slit is removed and the resulting spectrum is sent to a screen or a one dimensional detector, the pulse wavelength band can be monitored. For a more precise pulse
5 analysis, the pulse diagnostics 32 can comprise an autocorrelator which enables a direct, detailed measure of the pulse width and an indication of its phase coherence profile.

The laser microscope 10 also includes first,
10 second and third dichroic mirrors 34, 36 and 38 which are employed to split off the fluorescence pathway for each of the three detector alternatives. The first of these alternatives is known as descanned confocal detection. In
15 confocal detection, the fluorescence beam is descanned to form a stationary image plane at a pinhole aperture 40 placed before a confocal photomultiplier tube (PMT) 42. At every position in the scan, the point being illuminated in the
20 sample focuses to, or is confocal to, the aperture in the detector plane. A band pass emission filter 44 is positioned between the pinhole aperture 40 and the first dichroic mirror 34 to eliminate undesired frequencies from the detected
25 signals.

The second detection technique is known as Fourier plane detection in which the objective back aperture is focused through a lens 46 and a band pass emission filter 48 onto a Fourier PMT 50
30 without descanning. Because the back aperture is a pivot point in the scan, the fluorescence pattern is stationary at the photocathode.

Finally, the third detection technique is known as scanned imaging detection in which the
35 entire focal plane in the specimen 14 is focused

through a band pass emission filter 52 and a focusing lens 54 onto an imaging detector 56, such as a CCD camera, whose acquisition speed is synchronized to the frame scan time.

5 The initial choice of detection method may be dictated by an existing microscope setup or by the microscopy method necessary for the specific experiments planned. Each detection scenario offers its own particular advantages and
10 disadvantages. In all of these detection scenarios, the collected fluorescence is extracted by an appropriately coated dichroic mirror. Because the difference between excitation and emission wavelengths is typically much greater
15 than the Stokes shift, the dichroic coating need not have the usual sharp cut-on between the reflection transmission bands. The emission filters 44, 48 and 52 are usually standard, although they need to be checked for proper
20 rejection at the multi-photon excitation wavelengths. Because the ratio of the average excitation power to the fluorescence power is higher in multi-photon laser microscopy than in linear microscopies, a higher rejection ratio is
25 required. Photomultiplier selection for a red-insensitive photoelectron emitter is therefore beneficial.

For multi-photon excitation with more than two photons, say with N photons, the number of
30 photons absorbed per pulse per fluorophore can be written generally as:

$$35 \quad N_{na} \approx \left[\frac{P_0^N N_\delta}{(\tau f)^{N-1} f} \left(\frac{A^2}{2hc\lambda} \right)^N \right]$$

where the pre-superscript N designates the number of photons simultaneously absorbed in analogy in the two photon excitation case where N=2 described above. The ratio $N n_a / (N-1) n_a$ of successive rates
 5 for the multi-photon absorption process provides a useful comparison parameter of the form

$$\frac{N n_a}{(N-1) n_a} = \frac{P_0}{(hc/\lambda)} \cdot \frac{1}{\tau f} \cdot \frac{N \delta}{(N-1) \delta} \cdot \frac{A^2}{2} \cdot \frac{1}{\lambda^2}$$

10 Favorable values of the expected absorption cross sections are tabulated below.

	Number of Photons n	(Area) ⁿ A ⁿ (cm ²ⁿ)	(coincidence time) ⁿ⁻¹ ($\delta \tau$) ⁿ⁻¹	Excitation Cross Section	Units
15	1	10 ⁻¹⁶ cm ²	1	$\sigma = 10^{-16}$	cm ²
	2	10 ⁻³² cm ⁴	10 ⁻¹⁷ s	$\delta = 10^{-49}$	cm ⁴ (s/ photon)
	3	10 ⁻⁴⁸ cm ⁶	10 ⁻³⁴ s ²	$\gamma = 10^{-82}$	cm ⁶ (s/ photon) ²
20	4	10 ⁻⁶⁴ cm ⁸	10 ⁻⁵¹ s ³	$\epsilon = 10^{-115}$	cm ⁸ (s/ photon) ³

With these typical values of the multi-photon cross sections and the instrument parameters described for two-photon excitation above, the
 25 absorption ratio is unity at about 3 W laser power. However, this equal emission power depends specifically on the wavelength dependent cross sections. Higher ratios $N \delta / (N-1) \delta$ exist for known favorable fluorophores and more may be found in

research motivated by this invention and by other applications of multi-photon absorption. In applications to biological cells and tissues, the selection of higher order multi-photon excitation process and optimization of excitation wavelength provides a means to select conditions suitable to minimize biological photodamage during fluorescence microscopy and microscopic activation of caged compounds. For multi-photon laser microscopy or photochemistry the selection of higher order multiphoton processes accommodates selection of available laser wavelengths.

With multi-photon excitation with $N > 2$ the imaging resolution is improved relative to two-photon excitation since the microscope point spread function, which defines resolution, is multiplied by itself to the power N . Thus for three-photon excitation the resolution is further improved by nearly the same factor as insertion of an infinitesimal confocal aperture, neglecting wavelength factors which do reduce resolution as wavelengths increase.

FIGs. 2 and 3 illustrate the fluorescence intensity as a function of the incident photon flux density for three-photon excitation of Fura-2 at $1.0 \mu\text{m}$, and Indo-1 with Ca at $1.0 \mu\text{m}$,

respectively. In both cases, the fluorescence intensity increases in proportion to the cube of the incident photon flux density, clearly indicating three-photon excitation in the test materials.

Another advantage of multi-photon excitation by three or more photons, is that the favorable properties of two photon excitation are further enhanced in higher order processes because dependence of out of focus excitation falls off as successively higher powers N of the intensity with increasing values of photon order N .

Since three or more photon excitation in accordance with the present invention provides access by visible or infrared light to excitation energies corresponding to single-ultraviolet-photon excitation, a whole new class of fluorophores and fluorescent indicators becomes accessible to three-dimensionally resolved laser scanning microscopy. Although three or more photon cross sections are not yet known for many compounds, and different selection rules apply to three or more photon absorption, molecular asymmetry often allows both odd and even photon transitions into the same excited state. It has been found that effects of excited state symmetry

do appear to shift the relative values of odd photon and even photon absorption cross section peaks. Thus, an absorption peak for two-photon absorption sometimes appears at a significantly shorter wavelength than twice the dominant absorption peak for the one-photon process, and the wavelength dependence of three-photon absorption can resort to a wavelength dependence like thrice the one-photon case. Multi-photon excitation may be particularly strong in the case of incoherent multi-step excitation where absorption of one energy (say by absorption of two-photons) reaches an intermediate state from which a subsequent additional photon provides the energy to reach a state from which fluorescence or photochemical activation can occur.

Now all of the above fluorophores are routinely used for imaging fluorescent label distributions in living cells with two-photon excitation. Three-photon excitation of comparable fluorescence intensities have been obtained with Indo-1, FURA-2, DAPI and darnyl. The three-photon absorption cross sections are approximately $3\delta \sim 2 \times 10^{-82} \text{ cm}^6 (\text{S/photon})^2$. Three- and four-photon excitation of fluorescent amino acids in serotonin, norepinephrine and tryptophan have

been measured with red light excitation with one-photon absorption occurring below 300 nm. The use of three- and four-photon excitation by available lasers provides an advantage in microscale
5 detecting and imaging of scarce neurotransmitters and hormones.

Another application of the present invention is as a method for producing microscopically localized ablation of tissue or tissue organelles
10 for their destruction or surgical removal. This is accomplished through use of the three or more photon absorption either by intrinsic chromophores, or by extrinsically provided chromophores that label the tissue and provide
15 first characteristic energies for absorption of subpicosecond pulses of laser light providing the second characteristic energy which is about an integer fraction, i.e., one third, one fourth, etc., or less of the first characteristic energy.
20 Alternatively, the molecules providing the necessary fluorescence can be intrinsic tissue fluorophores.

Although the present invention has been disclosed in terms of a preferred embodiment, it
25 would be understood that numerous modifications and variations could be made thereto, without

18

departing from the scope of the invention as
defined in the following claims.

Claims

1. A method of microscopy by a three or more photon excitation technique of a target material containing molecules which are excitable by photons of a characteristic energy comprising the steps of:

illuminating said material with a beam of intense, subpicosecond pulses of laser light comprising photons of an energy approximately $1/n$ of said characteristic energy, where n equals a number of photons to be absorbed by said material and is greater than or equal to three; and

focusing said illumination within said material to produce an illumination intensity sufficiently high to produce molecular excitation by simultaneous absorption of at least three of said incident illuminating photons.

2. The method of claim 1, wherein said material includes cages biologically active molecules, said illumination intensity being sufficient to release caged biologically active compounds by simultaneous absorption of n incident photons, each of energy equal to approximately $1/n$ of said characteristic energy.

3. The method of claim 1, wherein said material includes fluorescent molecules, said illumination intensity being sufficient to produce fluorescence of said material by simultaneous
5 absorption of n incident photons, each of energy equal to approximately $1/n$ of said characteristic energy.

4. The method of claim 3, wherein said step of focusing said illumination further comprises
10 focusing said illumination to a small focal volume within said material to produce illumination intensity sufficiently high only at said focal volume to produce molecular excitation by simultaneous absorption of said n of said incident
15 illuminating photons.

5. The method of claim 4, further including the steps of:

scanning said beam to scan said focal volume through said material; and

20 detecting the fluorescence produced by said material.

6. The method of claim 1, wherein said material is a tissue, and said molecular

excitation occurs by simultaneous absorption of at least three of said incident illuminating photons by intrinsic chromophores, extrinsically provided chromophores or intrinsic fluorophores within said tissue.

7. An apparatus for laser scanning fluorescence microscopy of a target material including a fluorescent component responsive to excitation by photons of a characteristic energy to produce fluorescence photons, said apparatus comprising:

stage means for receiving said target material;

at least one source of subpicosecond coherent light pulses comprised of energy $1/n$ of said characteristic energy, where n is greater than or equal to three;

means for focusing said coherent light pulses on said target material, thereby causing said target material to absorb at least three photons and produce said fluorescence photons;

detector means for detecting said fluorescence photon; and

means for directing said fluorescence photons to said detector means.

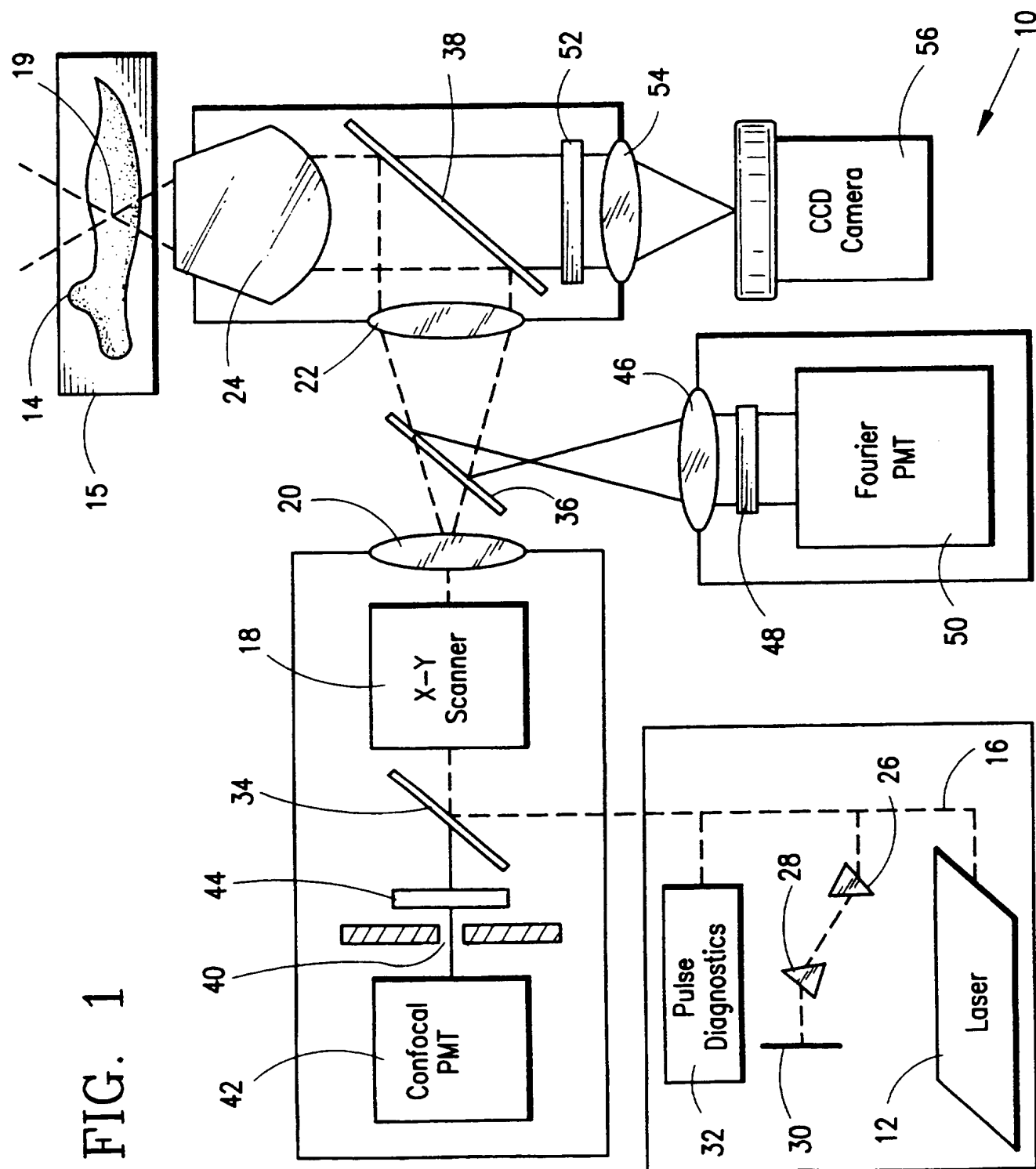
8. The apparatus of claim 7, further including scanning means for scanning said light pulses through said material.

9. The apparatus of claim 7, wherein said
5 detector means comprises a confocal photomultiplier tube.

10. The apparatus of claim 7, wherein said detector means comprises a Fourier plane detector.

11. The apparatus of claim 7, wherein said
10 detector means comprises an imaging detector.

1 / 3



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

2 / 3

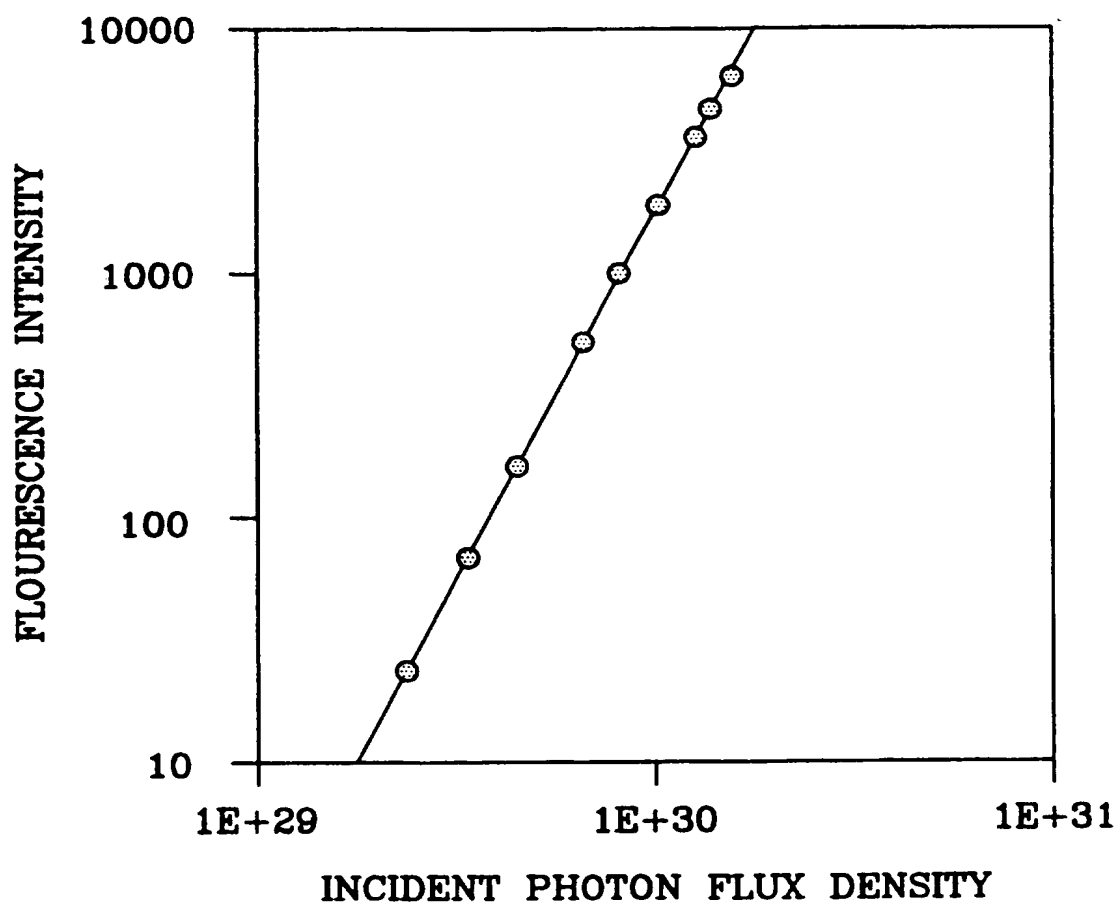


FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

3 / 3

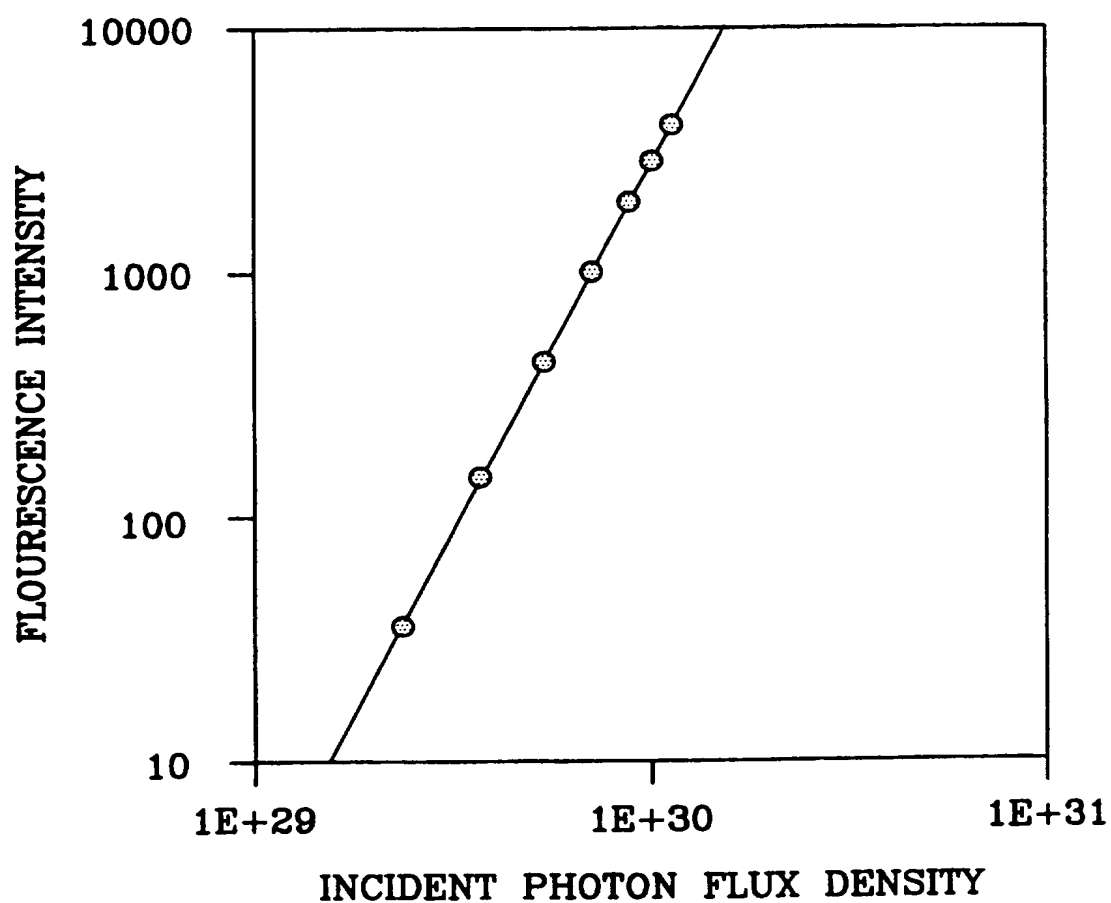


FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/14519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : G01N 21/64

US CL : 250/458.1; 459.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 250/458.1; 459.1, 461.1, 461.2

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS search terms: (two or three or multi)(w)(photon)(w)(absorption or excitation or fluorescence) and (laser(p)
?picosecond pulse#)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, A, 5,034,613 (DENK et al) 23 July 1991, see entire document.	1-11
A,P	US, A, 5,523,573 (HANNINEN et al) 04 June 1996, see entire document.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	* T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
* A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
* E* earlier document published on or after the international filing date	* Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
* L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* &* document member of the same patent family
* O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
* P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

18 OCTOBER 1996

Date of mailing of the international search report

31 OCT 1996

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

EDWARD J. GLICK

Telephone No. (703) 308-4858

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 43 26 473 A 1

⑤1 Int. Cl.⁶:
G 02 B 21/00
G 02 B 21/06

②1 Aktenzeichen: P 43 26 473.5
②2 Anmeldetag: 6. 8. 93
④3 Offenlegungstag: 9. 2. 95

DE 43 26 473 A 1

⑦1 Anmelder:
European Molecular Biology Laboratory, 69117
Heidelberg, DE

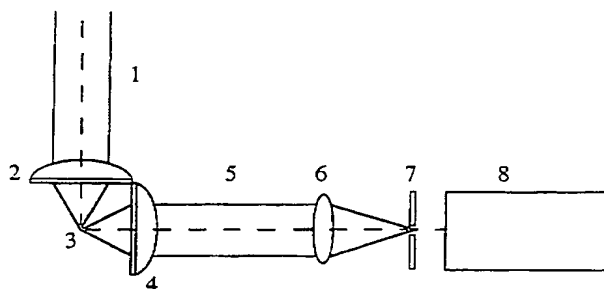
⑦2 Erfinder:
Stelzer, Ernst H.K., Dr., 69126 Heidelberg, DE;
Lindek, Steffen, 69115 Heidelberg, DE; Pick, Rainer,
69126 Heidelberg, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
DE 40 40 441 A1
DE 39 06 555 A1
DE 34 17 075 A1
US 43 50 892
JP 05-1 64 970 A2
JP 01-2 77 812 A2
JP 1-277812 A. In: Patents Abstracts of Japan, P-997,
Jan. 29, 1990, Vol. 14, No. 48;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Rastermikroskop zur Beobachtung unter einem Winkel zur Beleuchtung

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Rastermikroskop mit mindestens einer Lichtquelle, mindestens einem Lichtdetektor und mindestens zwei Objektiven, die mindestens einen, vorzugsweise gemeinsamen, Objektpunkt, vorzugsweise gleichzeitig, beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln, wobei mindestens zwei der Objektive nicht auf einer gemeinsamen Achse liegen. Die Beobachtung erfolgt in einem Winkel, vorzugsweise $\pi/2$, zur Beleuchtung der Probe. Das Beobachtungsvolumen kann durch geeignete erfindungsgemäße optische Anordnungen anisotrop verändert werden.



DE 43 26 473 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 12. 94 408 066/307

7/29



Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Rastermikroskop mit mindestens einer Lichtquelle, mindestens einem Lichtdetektor und mindestens zwei Objektiven, die mindestens einen, vorzugsweise gemeinsamen, Objektpunkt, vorzugsweise gleichzeitig, beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln, wobei mindestens zwei der Objektive nicht auf einer gemeinsamen Achse liegen.

Für die genaue dreidimensionale Erfassung eines Punktojektes oder eines Punktes eines Objekts mit einem Mikroskop ist die Auflösung entlang aller drei Raumachsen zu verbessern. Dieses kann mittels Vergrößerung der Apertur der Objektive oder/und mittels Verkleinerung der Wellenlängen des ein- und/oder ausgehenden Lichts erfolgen. Bisher wurde bei der Entwicklung von Mikroskopen besonderer Wert auf die Vergrößerung der Apertur der Objektive gelegt. Dadurch wird vor allem die Auflösung senkrecht zu der Beleuchtungsachse, die üblicherweise als optische Achse bezeichnet wird, erhöht. Aus der technisch-wissenschaftlichen Literatur sind konfokale Rastermikroskope bekannt, die eine Auflösung entlang der optischen Achse (axiale Auflösung) aufweisen und Bilder mit einer deutlich verbesserten Schärfe erzeugen können. Ein Problem ist, daß Objektive maximal 35% der um die optische Achse zentrierten Fläche erfassen. Das führt dazu, daß die axiale Auflösung bestenfalls dreimal so schlecht wie die axiale Auflösung ist. Im allgemeinen ist das Verhältnis größer.

Für die zusätzliche Erhöhung der Auflösung in axialer Richtung wurde in der DE-OS 40 40 441 ein doppelkonfokales Rastermikroskop vorgeschlagen, das durch die Verwendung eines zweiten Objektivs auf der anderen Seite der Objektebene gekennzeichnet ist, wobei beide Objektive einen gemeinsamen Objektpunkt gleichzeitig beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht detektieren. Wird das Objekt über die beiden Objektive kohärent beleuchtet, so wird das Beobachtungsvolumen durch Interferenz längs der optischen Achse reduziert. Zwei Probleme dieser Methode sind: a) Die Phasendifferenz im gemeinsamen geometrischen Fokus der Objektive ist a priori nicht zu bestimmen, so daß die Lichtverteilung zunächst unbekannt ist. Vorteilhafterweise muß die Phasendifferenz ein ganzzahliges Vielfaches von 2π sein, so daß die Interferenz konstruktiv ist. b) Im vorteilhaften Fall der konstruktiven Interferenz im geometrischen Fokus treten neben dem schmalen Hauptmaximum weitere axiale Nebenmaxima auf, so daß außer dem abzubildenden Punkt im geometrischen Fokus noch andere Punkte erheblich zu dem Signal des doppelkonfokalen Rastermikroskops beitragen. Aus diesen Gründen führt das doppelkonfokale Rastermikroskop zunächst nicht zu Bildern mit einer höheren Auflösung.

Diese bekannten Rastermikroskope definieren eine Objektebene und unterscheiden dadurch von dem erfindungsgemäßen Rastermikroskop. Sie sind nicht dazu geeignet, Licht, das senkrecht zur Beleuchtungsrichtung von dem abzubildenden Objektpunkt ausgeht, zu detektieren. Des weiteren unterscheiden sie sich durch die Definition einer optischen Achse und besitzen (im Fall des doppelkonfokalen Rastermikroskops) vorzugsweise zwei Objektive, die gegeneinander gerichtet und zu dieser optischen Achse und zueinander zentriert sind.

Das doppelkonfokale Rastermikroskop dient im Gegensatz zu dem erfindungsgemäßen Rastermikroskop zur Verbesserung der Auflösung allein mittels Interfe-

renz. Die tatsächliche Verbesserung der Auflösung hängt dabei von der Lösung der beiden oben genannten Probleme ab.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, ein Rastermikroskop vorzuschlagen, dessen Auflösung entlang aller drei Raumachsen in etwa gleich ist und das Beobachtungsvolumen kleiner als in den bekannten Rastermikroskopen ist. Die Aufgabe ist es, das Ziel auch zu erreichen, ohne daß die Phasendifferenz des Beleuchtungs- und des Detektionslichts bekannt sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß bei einem Rastermikroskop der eingangs genannten Art mindestens zwei Objektive derart angeordnet sind, daß sie mindestens einen Objektpunkt gleichzeitig beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln, wobei mindestens zwei der Objektive nicht auf einer gemeinsamen Achse liegen.

Zusätzlich können wie bei einem doppelkonfokalen Rasterlichtmikroskop Interferenzveränderungsmittel derart angeordnet sein, daß Licht, das ganz oder teilweise durch eines der Objektive hindurchgegangen ist, mit Licht, das ganz oder teilweise durch eines der anderen Objektive hindurchgegangen ist, am Objekt und/oder an mindestens einem der Lichtdetektoren kohärent oder teilweise kohärent überlagert wird, so daß es interferiert und eine gezielte Beeinflussung der Interferenzmuster durch Interferenzveränderungsmittel möglich ist.

Vorzugsweise sind zwei Objektive so angeordnet, daß sie auf denselben Objektpunkt fokussiert sind und ihre Achsen senkrecht aufeinander stehen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind drei Objektive so angeordnet, daß sie auf denselben Objektpunkt fokussiert sind und die Achsen zweier Objektive senkrecht aufeinander stehen, während die Achse des dritten Objektivs auf der Achse eines der beiden anderen Objektive liegt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind drei Objektive so angeordnet, daß ihre Achsen paarweise senkrecht aufeinander stehen.

Gemäß weiterer bevorzugter Ausführungsformen sind vier, fünf oder sechs Objektive so auf einer Kugeloberfläche um den gemeinsamen geometrischen Fokus und/oder den abzubildenden Punkt angeordnet, daß ihre Achsen beliebige Winkel zueinander einnehmen.

Gemäß weiterer besonders bevorzugter Ausführungsformen sind vier, fünf oder sechs Objektive senkrecht zu den Flächen eines Würfels angeordnet, in dessen Mitte der gemeinsame geometrische Fokus und/oder der abzubildende Objektpunkt liegt.

Vorteilhafterweise haben die Objektive die gleiche numerische Apertur oder auch verschiedene.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform befindet sich in mindestens einer der Ebenen, die zu den Fokalebene der Objektive optisch konjugiert sind, mindestens eine Blende. Eine Blende wird insbesondere dann vorgesehen, wenn sich die optisch zur Fokalebene konjugierte Ebene vor einem Lichtdetektor befindet, der das durch die Blende gegangene Licht registriert, und/oder wenn diese Blende im Beleuchtungsstrahl zur Formung der Lichtquelle dient. Diese Blende ist üblicherweise eine Lochblende.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird Interferenz bei der Überlagerung der Beleuchtungslichtstrahlen und/oder bei der Überlagerung der Detektionslichtstrahlen zur Verbesserung der Auflösung ausgenutzt. Dabei wird Licht, das ganz oder teil-

weise durch eines der Objektive hindurchgegangen ist, mit Licht, das ganz oder teilweise durch eines der anderen Objektive hindurchgegangen ist, am Objekt und/oder an mindestens einem der Lichtdetektoren kohärent oder teilweise kohärent überlagert, so daß es interferiert und eine gezielte Beeinflussung der Interferenzmuster durch Interferenzveränderungsmittel möglich ist. Hierbei können die Objektive, durch die die interferierenden Lichtstrahlen gehen, auf der gleichen Achse liegen oder auf Achsen, die einen Winkel bilden, der kleiner als π ist, liegen. Der Begriff der Objektebene verliert in diesem Aufbau seine übliche Bedeutung.

Vorteilhafterweise verändern die Interferenzveränderungsmittel die Interferenzmuster schnell oder auch langsam. Insbesondere verändert eine Kompensationsvorrichtung die Phasendifferenz zwischen den Lichtstrahlen, die durch eines der Objektive hindurchgehen, und den Lichtstrahlen, die durch ein anderes der Objektive hindurchgehen, schnell oder auch langsam.

Gemäß einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Veränderung der Interferenzmuster periodisch durchgeführt.

Das erfindungsgemäße Rastermikroskop kann ein Fluoreszenzmikroskop sein. Durch geeignete optisch aktive Elemente kann die Interferenz von Strahlen, die durch verschiedene Objektive fallen, bewirkt oder verhindert werden. Das erfindungsgemäße Rastermikroskop kann aber auch ein Mikroskop sein, das mit Streulicht arbeitet. Bei der Beobachtung von Streulicht können geeignete Polarisationsfilter in die Strahlengänge eingeführt werden. Geeignete optische Elemente sind beispielsweise Polarisatoren, spektrale Filter und optisch aktive Elemente, die die Polarisationsrichtung des Lichtes verändern.

Als Lichtquellen sind alle Quellen geeignet, die eine ausreichende Intensität zur Verfügung stellen. Vorteilhafterweise handelt es sich um Punktlichtquellen bzw. Quellen, die sich auf einen Punkt fokussieren lassen. Vorteilhafterweise wird bei Fluoreszenzmikroskopie ein gepulster oder auch nicht-gepulster Laser eingesetzt, der die Zwei- und/oder Mehrphotonenabsorption ermöglicht.

Die Umlenkung der Lichtstrahlen in dem Mikroskop findet über geeignete Umlenkelemente statt. Dies sind beispielsweise Spiegel, dichroitische Spiegel, Strahlteiler oder optische Fasern. Vorteilhafterweise entfällt in der Fluoreszenzmikroskopie bei der Detektion senkrecht zu der Beleuchtungsrichtung die Verwendung von dichroitischen Spiegeln im Detektionslichtpfad.

Als Lichtdetektoren sind Photomultiplier gut geeignet, aber auch Detektoren mit räumlicher Auflösung und auch andere Empfänger, die Lichtsignale in elektrische Signale bzw. in elektrisch auswertbare Signale umwandeln.

Die Erfindung wird nun anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 Eine Darstellung des Prinzips der Beobachtung unter einem Winkel zur Beleuchtung.

Fig. 2 Die schematische Darstellung des Strahlengangs in einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops.

Fig. 3 Die schematische Darstellung des Strahlengangs in einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops.

Fig. 1a stellt die Anordnung der Objektive und die Beobachtungsvolumina für eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops dar, bei dem zwei Objektive 2 und 4, deren Achsen

senkrecht aufeinander stehen, um den Objektpunkt 3 angeordnet sind.

Fig. 1b stellt die Anordnung der Objektive und die Beobachtungsvolumina für eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops dar, bei dem drei Objektive 2, 4 und 17, von denen zwei (2 und 4) senkrecht aufeinander stehen und das dritte Objektiv 17 auf einer gemeinsamen Achse mit einem der ersten beiden Objektive 2 liegt, um den Objektpunkt 3 angeordnet sind.

Links ist jeweils angegeben, wie die Objektive um den Objektpunkt 3 angeordnet sind. Die Pfeile deuten die Lichtwege 1 und 5 an. In **Fig. 1b** erfolgt demgemäß die Beleuchtung über zwei gegenüberstehende Objektive 2 und 17. Die beiden Teilbeleuchtungsstrahlen sind hierbei kohärent und die Phasendifferenz ist so eingestellt, daß sie im geometrischen Fokus konstruktiv interferieren.

Die zweite Graphik gibt jeweils das Beleuchtungsvolumen 18 bzw. 22, das längs der Beleuchtungsachse ausgedehnt ist, und die dritte Graphik das Detektionsvolumen 19 bzw. 23, das längs der Detektionsachse ausgedehnt ist, wieder. Die vierte Graphik stellt jeweils die Überlagerung des Beleuchtungs- und des Detektionsvolumens 20 bzw. 24 dar. Rechts wird schließlich jeweils das resultierende Beobachtungsvolumen 21 bzw. 25 der Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops dargestellt. Je kleiner das Volumen des Ellipsoids ist, desto besser ist die Auflösung des Mikroskops.

Wie in **Fig. 2** dargestellt wird das Licht der Lichtquelle, die vorteilhafterweise ein Laser ist, koilimiert. Das Licht des Beleuchtungsstrahls 1 fällt auf das Objektiv 2, das es auf den abzubildenden Punkt im Objekt 3 fokussiert. Ein zweites Objektiv 4 ist so angeordnet, daß es vorzugsweise auf den gleichen Punkt 3 fokussiert ist, aber nicht auf einer gemeinsamen Achse mit dem Objektiv 2 liegt. Das Objektiv 4 erfaßt das von dem abzubildenden Punkt 3 ausgehende Licht. Dieses Licht 5 wird über die Linse 6 in die Lochblende 7 fokussiert. Der Lichtdetektor 8 mißt vorzugsweise die Intensität des durch die Lochblende 7 gelangten Lichts. In dem Lichtweg können auch Spiegel und/oder andere Umlenkelemente angeordnet sein.

Das Beleuchtungslicht wird durch das Objektiv 2 fokussiert. Die Intensitätsverteilung im Fokalebereich des Objektivs 2 wird durch die Beleuchtungs-Punktverschmierungsfunktion (B-PVF) $|h_{be}(x,y,z)|^2$ beschrieben. Die B-PVF ist die Punktverschmierungsfunktion (PVF) eines konventionellen und die B-PVF eines konfokalen Mikroskops. Die Wahrscheinlichkeit, mit der das von dem Fokalebereich ausgehende Licht durch das Objektiv 4 detektiert wird, beschreibt die Detektions-Punktverschmierungsfunktion (D-PVF) $|h_{det}(x,y,z)|^2$. Die PVF eines konfokalen Mikroskops und also auch des erfindungsgemäßen Mikroskops ergibt sich aus dem Produkt der B-PVF und der D-PVF. Die räumliche Begrenzung der PVF ist ein Maß für die Auflösung des Mikroskops. Durch die Drehung der D-PVF gegen die B-PVF um einen Winkel, der kleiner oder größer als π ist, wird die B-PVF mit einer D-PVF multipliziert, die eine wesentlich geringere Ausdehnung längs der Beleuchtungsachse hat. Die Beleuchtungsachse ist die Achse des Objektivs 2, das zur Beleuchtung verwendet wird. Dadurch wird die Ausdehnung der PVF längs dieser Achse deutlich geringer als bei den bisher bekannten konfokalen Mikroskopen. Die Ausdehnung längs der Achse des Objektivs 4 nimmt nur wenig zu, so daß insgesamt das Volumen der PVF des Mikroskops abnimmt und auch

insgesamt eine Auflösungsverbesserung eintritt.

Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops besitzt die höchste Auflösung, die ein Fernfeld-Lichtmikroskop mit zwei Objektiven ohne die Benutzung von Interferenz haben kann. Durch die Unabhängigkeit von einem Interferenzmuster ist das erfindungsgemäße Mikroskop nicht mit der Problematik der Phasendifferenz behaftet. Der Begriff der Objektebene verliert in diesem Aufbau seine herkömmliche Bedeutung.

Falls Objektrasterung durchgeführt wird, befindet sich das Objekt auf einem — hier nicht eingezeichneten — Tisch, der die vorteilhafterweise beliebige Translation und/oder Rotation des Objekts erlaubt. Falls Strahlrasterung vorgesehen ist, ist eine — hier nicht eingezeichnete — Rastereinheit in dem Beleuchtungsstrahlengang angeordnet, die den Beleuchtungspunkt durch das Objekt bewegt. Gleichzeitig muß auch der Detektionspunkt verändert werden, so daß Beleuchtungs- und Detektionspunkt im Objekt unter kontrollierten Bedingungen verändert werden.

In Fig. 3 ist die schematische Darstellung einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rastermikroskops dargestellt, das die Interferenz der Beleuchtungslichtstrahlen im abzubildenden Objektpunkt zur Verbesserung der Auflösung ausnutzt.

Das Licht 1 wird von dem Strahlteiler 9 in zwei zueinander kohärente Lichtstrahlen aufgespalten. Der nach oben abgespaltene Teil des Lichts wird mit Hilfe von Spiegeln 13 und 14 oder anderen Umlenkelementen auf das Objektiv 2 gelenkt. Der nach unten abgespaltene Teil des Lichts wird mit Hilfe von Spiegeln 10, 11 und 12 oder anderen Umlenkelementen auf das Objektiv 17 gelenkt. Das Objektiv 2 fokussiert das auf es treffende Licht auf den abzubildenden Punkt 3 in dem Objekt. Das zweite Objektiv 17 ist vorzugsweise so angeordnet, daß es auf derselben Achse liegt wie das erste Objektiv 2 und vorzugsweise auf den gleichen Punkt 3 fokussiert ist. Ein drittes Objektiv 4 ist so angeordnet, daß es auf den gleichen Punkt 3 wie die beiden Objektive 2 und 17 fokussiert ist, aber nicht auf einer gemeinsamen Achse mit den beiden Objektiven liegt. Dieses Objektiv 4 sammelt das von dem abzubildenden Punkt 3 ausgehende Licht. Dieses Licht 5 wird über die Linse 6 in die Lochblende 7 gelenkt. Der Lichtdetektor 8 mißt das Signal des durch die Lochblende 7 gelangten Lichts. In beiden Teilbeleuchtungsstrahlengängen sind Kompensationsvorrichtungen 15 und 16 angeordnet, die zur Veränderung der Phasendifferenz zwischen den oberen und unteren Teilstrahlen dienen und die Interferenz der Teilstrahlen im Objekt gewährleisten.

Die räumliche Kohärenz der Beleuchtung ist durch die geeignete Wahl der Lichtquelle gewährleistet. Im Fokalebereich interferieren die Teilbeleuchtungsstrahlen zu einer B-PVF $|h_{4P}(x,y,z)|^2$, die räumlich stärker begrenzt ist, als die B-PVF in einem herkömmlichen Mikroskop. Ist die Phasendifferenz zwischen den beiden Beleuchtungsteilstrahlen im Objektpunkt 3 gleich null oder ein ganzzahliges Vielfaches von 2π , so ist die Interferenz konstruktiv und die B-PVF hat ein Maximum im Objektpunkt 3. Die B-PVF weist aber mehrere Nebenmaxima längs der Beleuchtungsachse auf, die die Auflösung herabsetzen. Das erste Intensitätsmaximum von $|h_{4P}(x,y,z)|^2$ liegt etwa eine halbe Wellenlänge vom absoluten Intensitätsmaximum im Brennpunkt entfernt. Diese Nebenmaxima werden aber nun durch eine Detektion unter einem Winkel von vorteilhafterweise $\pi/2$ effektiv unterdrückt, da die Ausdehnung der D-PVF längs

der Beleuchtungsachse sehr klein ist. Dadurch hat die PVF des erfindungsgemäßen Mikroskops eine axiale Ausdehnung, die im wesentlichen durch die des Hauptmaximums der B-PVF $|h_{4P}(x,y,z)|^2$ bestimmt wird. Dies bedeutet, daß die Auflösung im erfindungsgemäßen Mikroskop substantiell verbessert wird.

Bezugszeichenliste

10 Zeichnung zur Zusammenfassung und Zeichnung 2

- 1 Beleuchtungsstrahl
- 2 Beleuchtungsobjektiv
- 3 Objektpunkt
- 15 4 Detektionsobjektiv
- 5 Detektionsstrahl
- 6 Linse
- 7 Blende
- 8 Lichtdetektor

Zeichnung 1

- a) Ausführungsform mit zwei Objektiven
- b) Ausführungsform mit drei Objektiven

25 Jeweils von links nach rechts:
Anordnung der Objektive; Beleuchtungsvolumen; Detektionsvolumen; Überlagerung von Beleuchtungs- und Detektionsvolumen; resultierendes Volumen

30 Zeichnung 3

- 1 Beleuchtungsstrahl
- 2 Beleuchtungsobjektiv
- 35 3 Objektpunkt
- 4 Detektionsobjektiv
- 5 Detektionsstrahl
- 6 Linse
- 7 Blende
- 40 8 Lichtdetektor
- 9 Strahlteiler
- 10—14 Spiegel
- 15, 16 Interferenzveränderungsmittel
- 17 Beleuchtungsobjektiv.

45 Patentansprüche

1. Mikroskop mit mindestens einer Lichtquelle, mindestens einem Lichtdetektor und mindestens zwei Objektiven, die mindestens einen Objektpunkt beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens zwei der Objektive nicht auf einer gemeinsamen Achse liegen.
2. Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Objektive mindestens einen Objektpunkt gleichzeitig beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln.
3. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Objektive mindestens einen gemeinsamen Objektpunkt beleuchten und/oder das von ihm ausgehende Licht sammeln.
4. Mikroskop nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Interferenzveränderungsmittel derart angeordnet sind, daß Licht, das ganz oder teilweise durch eines der Objektive hindurchgegangen ist, mit Licht, das ganz oder teilweise durch ein anderes der Objekti-

ve hindurchgegangen ist, am Objekt und/oder an mindestens einem der Detektoren kohärent oder teilweise kohärent überlagert wird, so daß es interferiert und eine gezielte Beeinflussung der Interferenzen möglich ist.

5. Mikroskop nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß an dem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem der Lichtdetektoren zumindest zeitweise konstruktive Interferenz auftritt.

6. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwei Objektive so angeordnet sind, daß sie auf denselben Objektpunkt fokussiert sind und ihre Achsen senkrecht aufeinander stehen.

7. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der mindestens drei Objektive eine gemeinsame Achse haben.

8. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß drei Objektive so angeordnet sind, daß ihre Achsen paarweise senkrecht aufeinander stehen.

9. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß drei, vier, fünf oder sechs Objektive so auf einer Kugeloberfläche um den gemeinsamen geometrischen Fokus und/oder den abzubildenden Punkt angeordnet sind, daß ihre Achsen beliebige Winkel zueinander einnehmen.

10. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß vier, fünf oder sechs Objektive senkrecht zu den Flächen eines Würfels angeordnet sind, in dessen Mitte der gemeinsame geometrische Fokus und/oder der abzubildende Objektpunkt liegt.

11. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Objektive die gleiche numerische Apertur oder auch verschiedene numerische Aperturen haben.

12. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sich in mindestens einer Ebene, die zu einer der Fokalebene der Objektive optisch konjugiert ist, mindestens eine Blende befindet.

13. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Interferenzveränderungsmittel an dem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem der Detektoren eine Überlagerung kohärenter oder teilweise kohärenter Lichtstrahlen ermöglicht, die jeweils durch verschiedene Objektive getreten sind.

14. Mikroskop nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Kompensationsvorrichtung an dem abzubildenden Objektpunkt und/oder an mindestens einem der Detektoren zumindest zeitweise konstruktive Interferenz der Lichtstrahlen hervorruft.

15. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Interferenzen durch die Interferenzveränderungsmittel schnell oder auch langsam durchgeführt wird.

16. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Interferenzen periodisch durchgeführt wird.

17. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Signalauswertung zumindest teilweise mit einem Computer erfolgt.

18. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Anordnung von optischen Elementen zur Veränderung der Amplitude und/oder der Polarisation und/oder des Frequenzbereichs und/oder anderer Eigenschaften des Lichts in den Beleuchtungs- und/oder den Detektionsstrahlengängen vorgesehen sind.

19. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Fluoreszenzmikroskop oder als Mikroskop zur Beobachtung von Streu- oder Reflexionslichts verwendet wird.

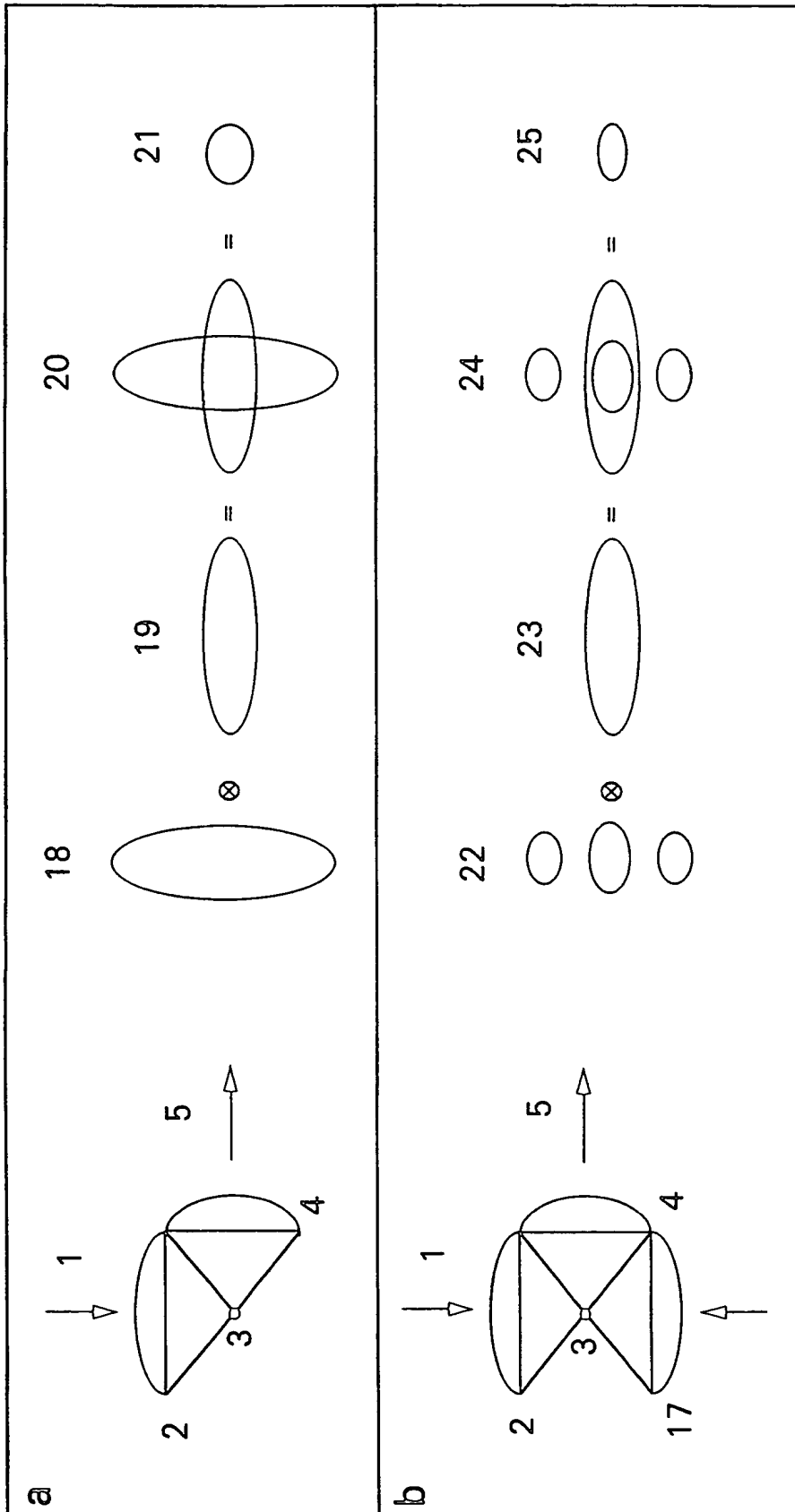
20. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lichtquelle eingesetzt wird, die Mehrphotonenabsorption ermöglicht, insbesondere ein Laser, der Zweiphotonenabsorption ermöglicht.

21. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zu einer der Fokalebene konjugierten Blenden entfernt und/oder ausgetauscht und/oder in ihrer Öffnung variiert und/oder parallel und/oder senkrecht zu dem Lichtweg verschoben werden können.

22. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Beleuchtungs- und/oder Detektionslicht durch optische Fasern gelenkt wird.

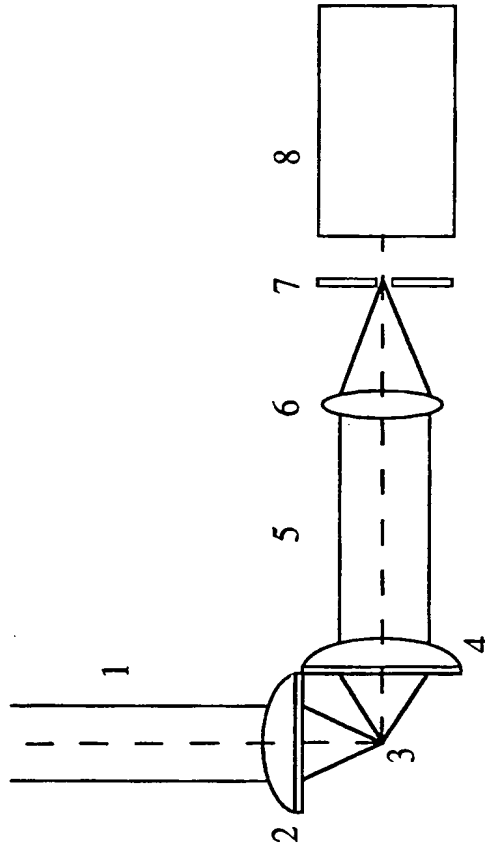
23. Mikroskop nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich optische Elemente mit mindestens einem Lichtdetektor angeordnet sind, insbesondere um zusätzliche Bilder, beispielsweise mit doppelkonfokaler oder herkömmlich konfokaler oder konventioneller Auflösung zu erhalten.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

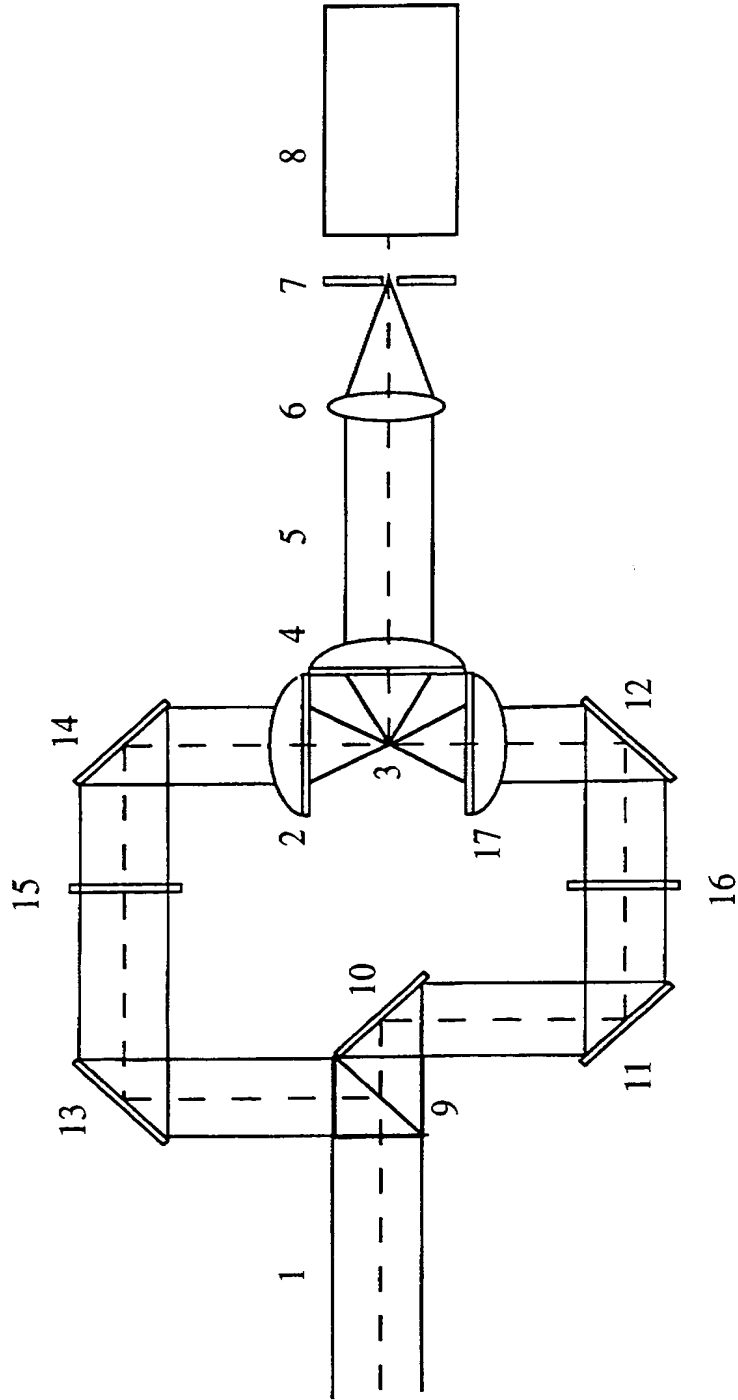


Zeichnung 1

Zeichnung 2



Zeichnung 3



15129/PCT Hz/ap

Verfahren und Vorrichtung zur Objektabbildung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Objektabbildung mit hohem räumlichen Auflösungsvermögen, insbesondere ein lichtmikroskopisches Abbildungsverfahren, und Vorrichtungen zur Durchführung eines derartigen Verfahrens.

Das Auflösungsvermögen optischer Abbildungssysteme wird oft entscheidend durch die objektseitige Apertur einer Objektivlinse und deren Brechzahl bestimmt. Von einem Objekt ausgehendes Licht kann nur erfasst werden, wenn es innerhalb des Akzeptanzwinkels des Objektivs auf dieses trifft. Je höher das Auflösungsvermögen ist, desto höhere Orts- oder Raumfrequenzen der abzubildenden Objektstruktur können erfasst werden. Die Erfassung der Raumfrequenzen wird durch die lichtoptische Transferfunktion oder Modulationsübertragungsfunktion (im Folgenden: OTF) des optischen Systems beschrieben. Die OTF gibt an, welche Raumfrequenzen, aus denen sich das Objekt mittels Fouriertransformation zusammengesetzt konstruieren lässt, bei der optischen Abbildung erhalten bleiben, bzw. wie Raumfrequenzanteile geschwächt werden. Das Auflösungsvermögen des optischen Systems (z. B. eines Lichtmikroskops) ist durch den Bereich bestimmt, in dem die OTF des Systems nicht verschwindet. Verschwindet die OTF in Abschnitten des reziproken Raumes vollständig, so ist es unmöglich, ohne zusätzliche Annahmen über die Objektstruktur (z. B. räumliche Beschränktheit, Positivität) die entsprechenden Raumfrequenzen in einer Objektabbildung zu rekonstruieren. Es besteht allgemein ein Interesse an der Ausdehnung der OTF auf einen möglichst großen Bereich im reziproken Raum, um die Auflösung des optischen Systems zu erhöhen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Herkömmliche Verfahren zur Erhöhung des Auflösungsvermögens sind insbesondere auf eine geeignete Wahl der Objektbeleuchtung gerichtet. So wird bspw. beim konfokalen Mikroskop mit einem fokussierten Lichtstrahl das Objekt von einer Seite möglichst punktwise beleuchtet und gleichzeitig abgetastet (gescannt), wobei oft die Detektion mittels einer Blende auf einen kleinen Bereich des Objekts begrenzt wird (siehe z. B. US-A 4 631 581).

Bei dem in EP 0 491 289 beschriebenen 4Pi-Mikroskop wird von beiden Objektseiten kohärent beleuchtet und je nach Ausführung auch detektiert. Beim Wellenfeldmikroskop wird üblicherweise mit kohärenten ebenen Lichtwellen von gegenüberliegenden Seiten beleuchtet (siehe z. B. US-A 4 621 911; F. Lanny et al. in „Bioimaging“, Band 1, 1993, Seite 187 ff.; US-A 5 801 881). Beim I⁵M-Mikroskop wird sowohl kohärent von beiden Seiten beleuchtet, als auch kohärent detektiert, indem die beiden Bilder des Objekts auf einem ortsauflösenden Detektor zur Interferenz gebracht werden (siehe US-A 5 671 085; M.G.L. Gustafsson et al. in „Proceedings of SPIE“, Band 2655, 1996, Seite 62 ff.). Von E.H.K. Stelzer et al. in „Opt. Commun“ Band 111, 1994, Seite 536 ff. und S. Lindeck et al. in „Handbook of Biological Confocal Microscopy“, Herausgeber J.B. Pawley, Plenum Press, New York 1995, Kapitel 26, Seite 417 ff: wird ein Theta-Mikroskop beschrieben, bei dem Licht von drei Seiten detektiert wird, wobei mit konfokaler oder 4Pi-ähnlicher Beleuchtung gearbeitet wird. Da bei der seitlichen Detektion in der Objektebene die Auflösung entlang der optischen Achse der Beleuchtung besonders groß ist, erhält man insgesamt ein verkleinertes Fokusvolumen.

Es ist auch bekannt, in stereomikroskopischen Oberflächentopographie-Verfahren eine räumlich variierende Beleuchtung (z.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

B. sinus-förmig variierend) zu verwenden. Durch Verrechnung der gemessenen Bilder kann auf die Oberflächenstruktur des Objekts rückgeschlossen werden (siehe z. B. US-A 4 525 858; R. Windecker et al. in „Optical Engineering“, Band 36, 1997, Seite 3372 ff.).

Ein Verfahren zur hochauflösenden dreidimensionalen Bildgebung durch Erfassung optischer Schnitte des Objekts ähnlich zur konfokalen Mikroskopie ist in WO 97/31282 beschrieben. Es basiert auf der Aufnahme mehrerer Bilder mit jeweils unterschiedlichen Mustern aus Beleuchtungslochblenden und zugehörigen Detektionslochblenden. Durch geeignete Rekonstruktionsverfahren lässt sich aus den aufgenommenen Daten ein Bild berechnen, das dem eines konfokalen Mikroskops äquivalent ist. Dieses Verfahren wird auch als „Aperture Correlation Microscopy“ bezeichnet (siehe auch R. Juskaitis et al. in „Nature“ Band 383, 1996, Seite 804 ff., T. Wilson et al. in „Proceedings of the SPIE“, Band 2984, 1997, Seite 21 ff.). Aus WO 98/45745 ist ein Verfahren bekannt, das auf der Beleuchtung unter Abbildung eines Beugungsgitters oder mit zwei interferierenden Laserstrahlen beruht (siehe auch T. Wilson et al. in „Cell Vision“, Band 4, 1997, Seite 231 ff.). In der Publikation von R. Heintzmann et al. in „Proceedings of SPIE“ Band 3568, 1999, Seite 185 ff. wird ein ähnliches Verfahren zur lateralen Erhöhung des Auflösungsvermögens eingesetzt.

Die herkömmlichen Techniken besitzen die folgenden Nachteile. Die Abbildungsverfahren sind mit einem relativ großen technischen Aufwand verbunden. So ist insbesondere bei den 4Pi-, I⁵M- und Theta-Mikroskopen die Justierung besonders schwierig. Die Verfahren sind außerdem nur schwer zu realisieren, da sie lediglich mit großem Aufwand in vorhandene Mikroskopsysteme integrierbar sind. Beim Wellenfeldmikroskop ist es ein großes Problem, dass die OTF in axialer Richtung Be-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

reiche aufweist, an denen sie verschwindet. Außerdem liefert das Wellenfeldmikroskop bzw. das 4Pi-Mikroskop in lateraler Richtung, verglichen mit der herkömmlichen Epi-Fluoreszenz-Mikroskopie bzw. der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie, keinen Auflösungsgewinn.

Des Weiteren sind viele Verfahren (insbesondere die konfokale Laserscanning-4Pi- und Theta-Mikroskopie) mit einem punkweisen Abrastern des Objekts verbunden. Dies ist zeitaufwendig und vor allem bei der Bildgebung zeitabhängiger Vorgänge problematisch. Abtastende Verfahren benötigen sehr schnelle Detektoren (z. B. Photomultiplier), die jedoch gegenüber langsameren Detektoren mit Ortsauflösung (z. B. CCD's) oft eine deutlich niedrigere Detektionseffizienz besitzen. Bei der Fluoreszenz-Mikroskopie kommt noch erschwerend hinzu, dass die sinnvolle Beleuchtungsstärke durch die maximale Anregungsrate der Farbstoffe im Fokus beschränkt ist. Dies begrenzt die maximale Abtastgeschwindigkeit zusätzlich.

Es sind auch mikroskopische Abbildungsverfahren auf der Basis nicht-linearer Effekte bekannt. So wird bspw. in US-A-5 034 613, US-A-5 777 732, US-A-5 828 459 und US-A-5 796 112 die sog. Mehrphotonen-Mikroskopie beschrieben. Der konfokale Effekt wird dabei durch die gleichzeitige Absorption mehrerer Photonen an bestimmten Objektorten erzielt. Andere Techniken basieren auf der stimulierten Emission (siehe US-A-5 731 588, DE-OS 44 16 558) oder dem Entvölkern des Grundzustandes von Fluoreszenz-Molekülen, indem diese gezielt in den längerlebigen Triplettzustand gepumpt werden (siehe S.W. Hell et al. in „Applied Physics B“, Band 60, 1995, Seite 495 ff.).

Mit den Verfahren auf der Grundlage nicht-linearer optischer Effekte konnte bisher keine erhebliche Erhöhung des Auflösungsvermögens erreicht werden. Dies hängt insbesondere damit

THIS PAGE BLANK (USPTO)

zusammen, dass zur Erzielung von Mehrphotonen-Absorptionen die einzelnen Photonen relativ geringe Energien und somit große Wellenlängen besitzen müssen. Außerdem ist die Übertragungseffizienz bei hohen Raumfrequenzen im Allgemeinen sehr schlecht, weil typischerweise nur ein sehr kleiner Teil des Beleuchtungsmusters hohe Raumfrequenzen enthält.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Abbildungsverfahren mit einem hohen Auflösungsvermögen anzugeben. Das Verfahren soll insbesondere die o. g. Nachteile herkömmlicher Mikroskopie-Verfahren überwinden, mit einem vereinfachten technischen Aufwand realisierbar sein, eine schnelle Bildaufnahme auch zeitabhängiger Vorgänge erlauben und mit herkömmlichen optischen Systemen kompatibel sein. Das erfindungsgemäße Verfahren soll des Weiteren ermöglichen, bekannte mikroskopische Verfahren unter Beibehaltung ihrer jeweiligen Vorteile so zu erweitern, dass das Auflösungsvermögen zusätzlich gesteigert wird. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, ein optisches System zur Durchführung derart verbesserter Verfahren anzugeben.

Diese Aufgaben werden durch ein Verfahren und ein optisches System mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 14 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung ist es, zur Gewinnung einer Objektabbildung (Bild einer Objektstruktur) mindestens zwei Teilbilder eines Objekts unter jeweils verschiedenen Objektbedingungen aufzunehmen, die am Objekt mit räumlichen Mustern ausgebildet sind, wobei jeweils für einen Objektpunkt eine nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt her detektierten Lichtes von den am Objektpunkt gegebenen Objektbedingungen besteht und die Teilbilder unterschiedliche Beiträge ver-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

schiedener Raumfrequenzanteile der Objektstruktur enthalten, und aus den Teilbildern durch Rekonstruktion der Raumfrequenzanteile die gewünschte Objektabbildung zu gewinnen. Die Einstellung von Objektbedingungen mit verschiedenen räumlichen Mustern zur Erfassung der verschiedenen Teilbilder besitzt den Vorteil, dass virtuell nieder- und höherfrequente Raumfrequenzanteile im Muster der Objektbedingungen erzeugt werden, an die die Raumfrequenzanteile der Objektstruktur gekoppelt sind. Durch diese Kopplung werden die Raumfrequenzanteile der Objektstruktur in Bezug auf das Raumfrequenzintervall verschoben, das entsprechend der lichtoptischen Transferfunktion (OTF) für eine Bilderfassung offen ist. Aus den Teilbildern kann die vollständige Objektabbildung mit einem entsprechend erweiterten Raumfrequenzbereich rekonstruiert werden.

Durch Ausnutzung eines nicht-linearen Zusammenhangs zwischen vom Objekt ausgehenden Licht und dem lokalen, objektpunktbezogenen Wert einer weiteren räumlichen veränderlichen Größe (z. B. der lokalen Einstrahlungs- oder Beleuchtungsintensität) lässt sich der vom Gesamtsystem effektiv übertragene Raumfrequenzbereich beträchtlich erweitern. Durch lokale Variation der Einflussgröße und die Aufnahme mehrerer Teilbilder lässt sich eine Objektabbildung rekonstruieren, deren Auflösung aufgrund der Nicht-Linearität fundamental höher als die durch das Abbe-Limit gegebene Auflösung ist. Zur Erzeugung nicht-linearer Effekte können verschiedene Möglichkeiten anwendungsabhängig gewählt werden. Ebenfalls ist die Gewinnung der Objektabbildung aus den Teilbildern anwendungsabhängig mit verschiedenen Arten der Datenauswertung möglich.

Ein wichtiges Merkmal der Erfindung ist die Einstellung vorbestimmter Objektbedingungen mit verschiedenen räumlichen Mustern. Am Objekt werden entsprechend dem jeweiligen Muster

THIS PAGE BLANK (USPTO)

punktweise Objektbedingungen eingestellt, von denen das erfasste Licht nicht-linear abhängig ist. Gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung ist die Einstellung vorbestimmter Objektbedingungen die Bildung eines räumlichen Musters mindestens einer Objektbedingung, von der die erfasste Lichtmenge jeweils nicht-linear abhängig ist. Gemäß einer abgewandelten Ausführungsform der Erfindung umfasst die Einstellung vorbestimmter Objektbedingungen die Erzeugung eines räumlichen Musters von mindestens zwei verschiedenen Objektbedingungen, wobei eine Abhängigkeit der erfassten Lichtmenge von einer multiplikativen Verknüpfung der Objektbedingungen und eine lineare oder eine nicht-lineare Abhängigkeit der erfassten Lichtmenge von jeder der Objektbedingungen besteht. Allgemein wird von einer multi-linearen Abhängigkeit des erfassten Lichtes (z. B. der erfassten Lichtintensität oder Lichtphase) gesprochen.

Die Zahl der Teilbilder ist abhängig von der Zahl der bei der Bildrekonstruktion meßbaren und anwendungsabhängig zu berücksichtigenden Raumfrequenzanteile im Muster des vom Objekt ausgesandten Lichtes. Diese Zahl ist insbesondere von der verwendeten Objektbedingung zur Einführung der Nicht-Linearität und von der Qualität des realisierten Abbildungsverfahrens abhängig. Beträgt die Anzahl der genannten Raumfrequenzanteile Z , so sind in der Regel mindestens Z Teilbilder aufzunehmen. Es kann aber fallabhängig auch ausreichend sein, weniger Teilbilder aufzunehmen, wenn genügend Informationen zur Rekonstruktion der Objektabbildung vorliegen. Die Zahl der Teilbilder wird fest eingestellt oder automatisch in Abhängigkeit von der Qualität der gewonnenen Objektabbildung und/oder manuell vom Nutzer des optischen Systems eingestellt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt insbesondere die folgenden Schritte: (a) Anpassung der im Objekt herrschenden Bedingungen, die das von einem Objektpunkt ausgehende Licht zu beeinflussen imstande sind derart, daß eine nicht-lineare Abhängigkeit der von einem Objektpunkt detektierten Lichtintensität von dem Wert eines in mindestens einer Objektbedingung enthaltenen räumlichen Musters in mindestens einem detektierten Wert hervorgerufen wird oder eine jeweils zu einem Wert lineare Abhängigkeit der von diesem Objektpunkt detektierten Lichtintensität von den Werten mindestens zweier räumlicher Muster hervorgerufen wird, (b) Aufzeichnung mindestens eines Einzelbildes unter diesen Objektbedingungen, (c) Ändern der Objektbedingungen derart, daß unterschiedliche durch das Aufnahmeverfahren abgebildete Raumfrequenzanteile des Objekts sich in ihrer Amplitude und/oder Phasenbeziehung zueinander verändern, (d) Aufzeichnung wenigstens eines weiteren Einzelbildes unter jeweils gemäß (c) veränderten Objektbedingungen, und (e) Auswertung der gemessenen Bilder, indem die sich in den Einzelbildern unterschiedlich ausprägenden Objektbedingungen genutzt werden, um Informationen über das Objekt zurückzugewinnen, die zu Raumfrequenzen des Objekts gehören, welche durch eine einfache Abbildung mit dem Aufnahmeverfahren nicht zugänglich wären.

Ein erfindungsgemäßes optisches System zur Objektabbildung zeichnet sich insbesondere durch einen Mustergenerator, der zur Einstellung und Veränderung vorbestimmter räumlicher Muster von Objektbedingungen eingerichtet ist, von denen das von einem Objekt detektierte Licht nicht-linear abhängig ist, und einen Bildgenerator zur Rekonstruktion der Objektabbildung aus den erfassten Teilbildern aus.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Die Gewinnung von Objektabbildungen ist relativ einfach realisierbar. Die

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Justierung des optischen Systems beschränkt sich auf einen minimalen Justierungsaufwand. Die Erfindung kann durch Nachrüstung bestehender Abbildungssysteme implementiert werden.

Von besonderem Vorteil ist, dass hohe Raumfrequenzen, die in Abbildungsobjektiven ggf. stark unterdrückt werden, nun durch die Verschiebung im Frequenzraum effizienter detektiert werden können. Zusätzlich zum lateralen Auflösungsgewinn ergibt sich auch ein axialer Auflösungsgewinn und die Möglichkeit, zur optischen Achse senkrecht stehende Ebenen in axialer Richtung zu diskriminieren. Damit liefert die Erfindung vorteilhafte Verwendungen wie die Konfokalmikroskopie. Auch in axialer Richtung ergibt sich bei Ausnutzung der nicht-linearen Abhängigkeit der erfassten Lichtmenge von den Objektbedingungen die Möglichkeit zu einem erheblichen Auflösungsgewinn.

Die Erfindung ist mit Vorteil in Kombination mit herkömmlichen Abbildungsverfahren, insbesondere Mikroskopieverfahren, anwendbar. Dies betrifft insbesondere die o. g. Techniken und die Absorptionsmikroskopie, die Reflektionsmikroskopie, die orts aufgelöste Abbildung von Fluoreszenzlebensdauern (sog. „Fluorescence Lifetime Imaging“), die Mehrphotonenmikroskopie, Interferenzmikroskopie, Konfokalmikroskopie usw..

Das erfindungsgemäße Abbildungsverfahren besitzt eine hohe Geschwindigkeit der Bildaufnahme. Die Bildgebung kann z. B. mit einer CCD-Kamera an allen Objektpunkten in der Bildebene gleichzeitig erfolgen und ist daher deutlich schneller möglich, als bei abtastenden Verfahren.

Die Erfindung ist unter Verwendung der verschiedenartigsten nicht-linearen Effekte realisierbar. Bspw. kann in einem Fluoreszenzmikroskop die Beleuchtung mit einer derartigen In-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tensität erfolgen, dass Fluoreszenzfarbstoffe im Objekt gesättigt werden. Dies ermöglicht auch, verschiedene Farbstoffe oder Farbstoffe in verschiedenen Umgebungen (z. B. in verschiedenen Bindungszuständen), die sonst schlecht zu unterscheiden wären, aufgrund verschiedener nicht-linearer Eigenschaften (Sättigungseigenschaften) zu diskriminieren.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im Folgenden aus der Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

- Figur 1 eine Illustration der Objektbeleuchtung im reziproken Raum bei sinusförmiger Beleuchtung mit geringer Intensität,
- Figur 2 eine Illustration der Objektbeleuchtung im reziproken Raum bei einem nicht-linear verzerrten Anregungsmuster,
- Figur 3 eine Blockdarstellung eines erfindungsgemäßen optischen Systems,
- Figur 4 Einzelheiten eines optischen Systems gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung,
- Figur 5 Einzelheiten eines optischen Systems gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung,
- Figuren 6 und 7 Simulationsergebnisse zur Illustration eines erfindungsgemäßen Verfahrens,
- Figur 8 eine Kurvendarstellung zur Illustration des lateralen Auflösungsvermögens,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figur 9 eine Kurvendarstellung der effektiven Gesamt-OTF eines erfindungsgemäßen optischen Systems (mit Rekonstruktion), und

Figur 10 Beispiele vom Objektabbildungen.

Die Erfindung wird im Folgenden zunächst anhand der theoretischen Grundlagen und anschließend an verschiedenen Beispielen erläutert. Die Erfindung ist nicht auf die gegebenen Ausführungsbeispiele beschränkt. Insbesondere im Rahmen der folgenden Begriffsbestimmung sind abgewandelte Ausführungsformen unter entsprechend variierten Objektbedingungen anwendungsabhängig realisierbar.

Der bei einer optischen Abbildung zu erfassende Gegenstand oder Teilabschnitte des Gegenstands werden im Folgenden allgemein als „Objekt“ bezeichnet. Objekte sind insbesondere alle Formen von biologischen oder synthetischen Proben, wie sie mit herkömmlichen Abbildungsverfahren und ortsauflösenden Analyseverfahren, insbesondere Mikroskopie und Spektroskopieverfahren, untersucht werden. Anwendungen ergeben sich z. B. in der Biologie, Medizin, Chemie, Halbleitertechnik, Einzelmolekülspektroskopie u. dgl.. Das Objekt kann fest, flüssig oder auch gasförmig sein.

Unter „Objektbedingungen“ werden allgemein alle Parameter und/oder Bedingungen am Ort des Objektes verstanden, mit denen eine oder mehrere Eigenschaften des vom Objekt ausgehenden Lichtes beeinflussbar sind. Zu diesen Eigenschaften zählen insbesondere die Intensität, der Polarisationszustand, die Phase, die Farbe, die Pulsform, die Pulslänge, der Kohärenzgrad, die Photonenkorrelation und dergleichen. Objektbedingungen können inhärente physikalische oder chemische Ei-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

enschaften des Objekts, wie z. B. eine bestimmte stoffliche Zusammensetzung, eine Temperaturverteilung oder eine Druckverteilung, oder von außen aufgeprägte Parameter, wie z. B. die Beleuchtungsintensität auf der Objektoberfläche oder im Objekt, umfassen.

Die Ausbildung der Objektbedingungen mit einem räumlichen Muster bedeutet, daß die Objektbedingungen mit einer bestimmten Ortsabhängigkeit beschrieben werden können. Das Muster kann durch eine Struktur (z. B. ein Punkt- oder Strichmuster) charakterisiert sein oder auch strukturlos sein (für alle Objektpunkte gelten die gleichen Objektbedingungen). Die Aufnahme von Teilmildern unter verschiedenen Objektbedingungen bedeutet, daß zwischen den Aufnahmen das Muster an sich (z. B. mit einem DMD-Reflektor, s. u.), die Position und/oder Orientierung des Musters relativ zur Probe (z. B. mit einem verschiebbaren Beugungsgitter, s. u.) und/oder eine Intensitätseigenschaft des Musters (z. B. mit einer Variation der Intensität der Objektbeleuchtung, s. u.) verändert wird.

Eine „nicht-lineare Abhängigkeit“ des vom Objekt ausgehenden bzw. mit einem Detektor erfassten oder detektierten Lichtes ist gegeben, wenn dessen Lichtintensität von der jeweiligen Objektbedingung Ort der Lichtaussendung (oder -streuung oder dergleichen) messbar keinem einfachen linearen Modell folgt. In einer Funktionenentwicklung, z. B. Taylor-Entwicklung (siehe unten), des detektierten Lichts treten Terme höherer Ordnung auf. Gemäß den o. g. Ausführungsformen der Erfindung kann eine nicht-lineare Abhängigkeit der Lichtintensität jeweils von einer Objektbedingung oder eine lineare Abhängigkeit der Lichtintensität von mehreren Objektbedingungen gegeben sein. Im letzteren Fall treten in der Funktionenentwicklung Mischterme auf, die die unten erläuterte Erweiterung der detektierbaren Objekt-Raumfrequenzen erlauben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Die „detektierte Lichtintensität“, die die vom Detektor gemessene Lichtintensität ist, kann anwendungsabhängig je nach Funktionalität des Detektors von der am Ort des Detektors herrschenden mittleren Lichtintensität abweichen, wenn z. B. zeitlich moduliert detektiert wird oder ein rohes Detektorsignal mit anderen Signalen korreliert wird (z. B. durch Lock-In-Technik).

Unter einem „Teilbild“ oder „Einzelbild“ werden allgemein Bilddaten verstanden, die mit einem in weitesten Sinne abbildenden lichtoptischen Verfahren aufgenommen wurden. Es kann sich dabei um einen einzelnen Datenpunkt, mehrere an ein oder verschiedenen Objektpunkten aufgenommene Datenpunkte oder Datenpunktbereiche in ein, zwei, drei oder mehr Dimensionen handeln. Die erfindungsgemäße Änderung von Objektbedingungen bei Aufnahme verschiedener Teilbilder kann sich auf eine Änderung oder Modulierung bei jedem Datenpunkt, für Abschnitte oder Gruppen von Datenpunkten oder für ganze zwei- oder dreidimensionale Bilder oder sogar Zeitserien vorgesehen sein.

Unter „detektierbaren Raumfrequenzanteilen“ werden allgemein die Anteile des Frequenzraums der Fouriertransformierten des Objekts verstanden, die mit dem jeweils angewendeten Abbildungsverfahren prinzipiell detektierbar sind.

Die Erfindung erlaubt nicht nur eine Objektabbildung mit erhöhtem Auflösungsvermögen, sondern auch die Gewinnung von „Informationen über das Objekt“. Hierunter werden insbesondere die räumliche Verteilung einer oder mehrerer Eigenschaften des Objekts oder auch andere Parameter, wie z. B. die Position eines von seiner Struktur her bekannten Teilobjekts im Raum oder die Zusammensetzung des Objekts, verstanden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Grundlagen der Bilderfassung

Die Bildaufnahme wird im Folgenden am Beispiel der Fluoreszenzmikroskopie erläutert. In der Fluoreszenzmikroskopie werden Objekte abgebildet, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind oder selbstständig fluoreszieren. Je nach Objektstruktur und/oder Markierungstechnik sammeln sich z. B. Markierungsfarbstoffe in bestimmten Teilbereichen (z. B. im Zellkern einer biologischen Zelle). Zur Bildaufnahme wird das Objekt mit einer geeigneten Anregungswellenlänge bestrahlt und die emittierte Fluoreszenzstrahlung detektiert. Fluoreszenzfarbstoffe emittieren mit einer Intensität, die in ersten Näherung proportional zur Intensität des am Ort des Farbstoffs eingestrahlten Lichtes ist. Die Emission erfolgt im Unterschied zur Absorptionsmikroskopie, Reflektionsmikroskopie oder auch Phasenkontrastmikroskopie im allgemeinen inkohärent zueinander. Unter Annahme einer Proportionalität zwischen der an einem Objektpunkt ausgestrahlten Fluoreszenzintensität zur dort eingestrahlten Lichtintensität des Anregungslichts lässt sich ein detektiertes Bild $I_m(\vec{x})$ (rückübersetzt in Objektraumkoordinaten \vec{x}) wie folgt beschreiben. Die ortsabhängige Beleuchtungsintensität ($Bel(\vec{x})$) wird mit der am jeweiligen Objektpunkt vorhandenen Farbstoffkonzentration $Obj(\vec{x})$ (Objektstruktur) multipliziert und das Ergebnis mit der Punktbildfunktion („Point Spread Function“, PSF) des abbildenden Systems gefaltet (siehe Gleichung (1)).

$$I_m(\vec{x}) = PSF(\vec{x}) \otimes (Bel(\vec{x}) \cdot Obj(\vec{x})) \quad (1)$$

Im reziproken Raum übersetzt sich dies in die Faltung der fouriertransformierten Beleuchtungsfunktion $F(Bel(\vec{x}))$ mit der fouriertransformierten Objektfunktion $F(Obj(\vec{x}))$ und anschließende Multiplikation mit der lichtoptischen Transferfunktion

THIS PAGE BLANK (USPTO)

$\text{OTF}(\vec{k})$ (F bezeichnet hier und im Folgenden die Fourierformation, die Koordinaten im reziproken Raum werden mit \vec{k} bezeichnet). Analog zu Gleichung (1) ergibt sich:

$$F(I_m(\vec{x})) = \text{OTF}(\vec{k}) \cdot (F(\text{Bel}(\vec{x})) \otimes F(\text{Obj}(\vec{x})))$$

Verallgemeinert auf andere Mikroskopieverfahren bedeutet $\text{Obj}(\vec{x})$ den jeweiligen Wert oder die Dichte der Eigenschaften des Objekts, die zu erfassen ist, und $\text{PSF}(\vec{x})$ die effektive Punktbildfunktion des gesamten Systems (Bildaufnahme und -rekonstruktion). Auch bei iterativen oder nicht-linearen Rekonstruktionsverfahren gilt dies oft noch näherungsweise.

In herkömmlichen abbildenden Systemen ist der im Wert von Null verschiedene Bereich der OTF, der auch als „Träger“ bezeichnet wird, durch die numerische Apertur und die Wellenlänge des abzubildenden Lichts auf einen gewissen Raumfrequenzbereich eingeschränkt (siehe auch US-A-5 671 085). Gleichmaßen ist auch die Fouriertransformierte der Beleuchtungsfunktion $F(\text{Bel}(\vec{x}))$ in der Ausdehnung ihres Trägers durch die Lichtwellenlänge und ggf. Aperturen des Beleuchtungssystems eingeschränkt.

Erfindungsgemäß ist nun vorgesehen, den effektiven Bereich von detektierbaren Raumfrequenzen des Objekts $F(\text{Obj}(\vec{x}))$ („Objekt-Raumfrequenzen“) auf der Grundlage der folgenden Überlegungen zu erweitern. Bei Einführung einer nicht-linearen Abhängigkeit der erfassten Lichtintensität von den Objektbedingungen ist der rechte Teil von Gleichung (1) verallgemeinert gemäß den Ausdrücken (2) bzw. (3) zu schreiben:

$$\text{PSF}(\vec{x}) \otimes I_{em}(\text{Obj}(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x})) \quad (2)$$

$$\Leftrightarrow \text{OTF}(\vec{k}) \cdot F(I_{em}(\text{Obj}(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x}))) \quad (3)$$

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Entsprechend dem Ausdruck (2) wird kein linearer Zusammenhang zwischen der von einem Objektpunkt ausgehenden Lichtintensität $I_{em}(\vec{x})$ und der dort eingestrahlichten Lichtintensität (enthalten in $\vec{b}(\vec{x})$) vorausgesetzt. Vielmehr ist nun $I_{em}(\vec{x})$ eine allgemeine Funktion des Wertes der zu erfassenden Objektstruktur und anderer Faktoren $\vec{b}(\vec{x})$, die die nicht-linearen Bedingungen repräsentieren. Der Vektorpfeil über \vec{b} soll andeuten, dass es sich um mehrere Bedingungen oder Eigenschaften b_i handeln kann. Ein wichtiger Faktor b_i ist die am Ort \vec{x} eingestrahlichte Lichtintensität $Bel(\vec{x})$. Andere Faktoren werden unten beispielhaft genannt. Gemäß Gleichung (4) wird $I_{em}(\vec{x})$ als Taylor-Reihe mit konstanten Koeffizienten c_i angenähert ausgedrückt:

$$\begin{aligned} I_{em}(\vec{x}) \cong & c_0 + c_1 \cdot Obj(\vec{x}) + c_2 \cdot b_1(\vec{x}) + c_3 \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x}) \\ & + c_4 \cdot Obj(\vec{x})^2 \cdot b_1(\vec{x}) + c_5 \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x})^2 + \dots \\ & + c_6 \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x})^3 + \dots \end{aligned} \quad (4)$$

Zur vereinfachten Darstellung wird in Gleichung (4) nur auf eine nicht-lineare Bedingung $b_1(\vec{x})$ Bezug genommen. Anwendungsabhängig können weitere Bedingungen in den Prozess der Aussendung von Licht vom jeweiligen Objektpunkt involviert sein. In diesem Fall treten entsprechende Terme auch in der Entwicklung gemäß Gleichung (4) auf, so insbesondere auch Mischterme wie z. B. $c_{5b} \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x}) \cdot b_2(\vec{x})$. Der Term nach c_3 ist gerade der in Gleichung (1) genannte Ausdruck, wenn als nicht-lineare Objektbedingung $b_1(\vec{x}) = Bel(\vec{x})$ angenommen wird. Die Fouriertransformierte der ausgesandten Lichtintensität $F(I_{em}(Obj(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x})))$ enthält demnach analog zu Gleichung (1) den Term $c_3 \cdot F(Bel(\vec{x})) \otimes F(Obj(\vec{x}))$.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Die Fouriertransformierte der Beleuchtungsintensität $F(\text{Bel}(\vec{x}))$ ist als Summe einer Vielzahl von einzelnen δ -Funktionen darstellbar. Je nach dem aktuellen Beleuchtungsmuster werden also Teile der fouriertransformierten Objektfunktion $F(\text{Obj}(\vec{x}))$ durch die Faltung mit der fouriertransformierten Beleuchtungsfunktion verschoben und mit entsprechendem Gewicht addiert. Dies ist in Figur 1 illustriert.

Figur 1 zeigt die Struktur der Anregungsverteilung im reziproken Raum bei sinusförmig verteilter, geringer Beleuchtungsintensität entsprechend einer herkömmlichen, räumlich gemusterten Beleuchtung. Die nach oben gerichteten Pfeile bezeichnen die Maxima, die aus der sinusförmigen Anregung herühren (Fouriertransformierte der Sinusfunktion). Zusätzlich ist die an das Maximum k_b „gekoppelte“ Struktur der Fouriertransformierten der Objektfunktion $F(\text{Obj}_{+1}(k))$ eingezeichnet. Die an die anderen Maxima gekoppelten Fouriertransformierten der Objektfunktion sind aus Übersichtlichkeitsgründen nicht eingezeichnet. Tatsächlich ist jedoch, da $\text{Obj}(\vec{k})$ mit den virtuellen Raumfrequenzteilen im Muster der Objektbedingungen im reziproken Raum zu falten ist, $\text{Obj}(\vec{k})$ an jedes virtuelle Maximum „gekoppelt“. Nur der mittlere Teil an emittierten Raumfrequenzen (als Träger der OTF eingezeichnet) ist der Detektion zugänglich.

In Figur 1 ist beispielhaft illustriert, wie aus der Summe entsprechend der genannten Faltung durch die optische Abbildung (Multiplikation mit der raumfrequenzbegrenzten OTF) der detektierbare Bereich festgelegt („ausgestanzt“) wird. Der Bereich detektierbarer Objekt-Raumfrequenzen wird bei Beleuchtung mit einem bestimmten Muster deutlich gegenüber dem Fall einer gleichmäßigen Beleuchtung erweitert. Mit den unten

THIS PAGE BLANK (USPTO)

erläuterten Rekonstruktionsverfahren lassen sich die verschobenen Objekt-Raumfrequenzen wieder zu einem konsistenten Bild zusammensetzen.

Entsprechend Gleichung (4) liefern im nicht-linearen Fall aber auch Terme höherer Ordnung in $b_1(\vec{x})$ Beiträge zu I_{em} wie z. B. die Terme mit den Faktoren c_5 bzw. c_6 . Die Fouriertransformierten dieser Terme sind auch in $F(I_{em}(\text{Obj}(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x})))$ enthalten. Mit $b_1(\vec{x}) = \text{Bel}(\vec{x})$ erhält man im Ausdruck (2) auch den Term $c_5 \cdot [F(\text{Bel}(\vec{x})) \otimes F(\text{Bel}(\vec{x}))] \otimes F(\text{Obj}(\vec{x}))$. Mit einem gewissen Anteil im Bild ist es jetzt möglich, Raumfrequenzen des Objekts zu messen, die vorher noch nicht zugänglich waren, da sie durch die Faltung mit der raumfrequenzbegrenzten Funktion $F(\text{Bel}(\vec{x}))$ noch nicht in den mittels OTF detektierbaren Bereich geschoben werden konnten. Die Ausdehnung des Trägers von $F(\text{Bel}(\vec{x})) \otimes F(\text{Bel}(\vec{x}))$ kann nun aber entsprechend größer sein, wodurch sich auch höhere Raumfrequenzen in den der OTF entsprechenden Bereich verschieben und so in der Abbildung messbar sind. Weitere höhere Ordnungen wirken sich entsprechend in weiteren Faltungen mit den Fouriertransformierten der $b_1(\vec{x})$ aus, so dass noch höhere Objekt-Raumfrequenzen detektierbar sind. Im Prinzip ist es möglich, beliebig hohe Raumfrequenzen des Objekts zu detektieren und damit die Auflösung beliebig zu erhöhen, soweit entsprechende Koeffizienten in der Reihenentwicklung gemäß Gleichung (4) vorhanden sind. In der Praxis wird die bei der Rekonstruktion erzielbare Auflösung jedoch oft durch das bei den hohen Objekt-Raumfrequenzen erreichbare Signal-Rausch-Verhältnis begrenzt.

Das effektive Auftreten nieder- und höherfrequenter Komponenten des Beleuchtungsmusters im reziproken Raum ist in Figur 2 am Beispiel der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Wird das Objekt mit einer genügend hohen Beleuchtungsintensität be-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

strahlt, so ergibt sich eine nicht-lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzemission von der Anregungsintensität (Sättigung der Fluoreszenz) und damit ein Muster der Anregbarkeit von Fluoreszenz (im Folgenden: Anregungsmuster) eines bestimmten Farbstoffes, das grundsätzlich aus unendlich vielen (virtuellen) Maxima im reziproken Raum besteht, deren absolute Höhe allerdings mit steigendem $|\vec{k}|$ schnell abnimmt. Wie oben am Beispiel der relativ schwachen Anregungsintensität (linearer Fall, Figur 1) erläutert, ist die Objektfunktion an jede der Komponenten der Beleuchtungsfunktion gekoppelt. In einem als Teilbild I_{em} aufgenommenem Detektorsignal sind also alle Informationen, insbesondere über die interessierenden hochfrequenten Ortsfrequenzen der Objektfunktion enthalten. Die Rückgewinnung dieser Informationen wird unten in Zusammenhang mit der Bildrekonstruktion beschrieben.

Figur 2 illustriert die Struktur der Anregungsverteilung im reziproken Raum bei einem nicht-linear verzerrten Anregungsmuster. Zu dem virtuellen Maximum $n = +2$ entsprechend $2k_0$ ist eine gekoppelte Struktur der Fouriertransformierten der Objektfunktion eingezeichnet ($Obj_{+2}(\vec{k})$). Praktisch ist $Obj(\vec{k})$ wiederum an jedes Maximum gekoppelt (aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt) und mit verschobenen, unterschiedlich intensiven und phasengedrehten Versionen von sich selbst überlagert. Nur der mittlere Teil an emittierten Raumfrequenzen (Träger der OTF) ist der Detektion zugänglich.

Das Ziel der optischen Abbildung ist die Gewinnung einer Objektabbildung, d. h. der das Objekt beschreibenden Funktion $Obj(\vec{x})$. Diese Funktion muss aus den gemessenen Teilbildern I_m rekonstruiert werden. Die Rekonstruktion der Objektabbildung basiert darauf, dass die Faktoren $b_i(\vec{x})$ aus den Teilbildern I_m extrahiert werden oder unabhängig von der Bildaufnahme be-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

kannt sind. Die erfindungsgemäße Unterscheidung der Faktoren $b_i(\bar{x})$ von der das Objekt beschreibenden Funktion $\text{Obj}(\bar{x})$ erfolgt, indem die Faktoren b_i , d. h. die oft räumlich gemusterten Objektbedingungen, variiert werden.

Die Variation der Objektbedingungen kann auf verschiedene Arten erfolgen. Eine erste Möglichkeit besteht darin, $b_i(\bar{x})$ als ein räumliches Muster auszubilden, das am Objekt zur Aufnahme verschiedener Teil- oder Einzelbilder jeweils verschoben wird. Alternativ ist es aber auch möglich, die Stärke des Musters (Kontrast der eingestellten Objektbedingungen am gesamten Objekt) oder die Form des Musters jeweils für die Aufnahme von Teilbildern zu verändern. In jeden Falle werden die in der Entwicklung gemäß Gleichung (4) gezeigten Komponenten unterscheidbar.

Die Bilderfassung des erfindungsgemäßen Erfahrens basiert auf der Aufnahme von mindestens zwei Teilbildern mit verschiedenen Objektbedingungen, unter denen die Faktoren $b_i(\bar{x})$, mit denen die erfasste Lichtintensität in nicht-linearem Zusammenhang steht, variiert werden. Die Rekonstruktion der Objektabbildung aus den Teilbildern wird im Folgenden erläutert.

Rekonstruktion der Objektabbildung

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die in der Taylor-Entwicklung gemäß Gleichung (4) enthaltenen Terme, soweit sie einen messbaren Einfluss besitzen, durch das Lösen eines Gleichungssystems ermittelt und so voneinander getrennt. Das Gleichungssystem, dessen Ermittlung unten im Einzelnen erläutert ist, lässt sich trotz der Multiplikation mit der OTF an jedem Punkt im Bereich des Trägers der OTF im reziproken Raum bestimmen und im Prinzip lösen. Durch

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Verschiebung in Fourierraum (oder durch Multiplikation mit $\exp(i\vec{\Delta k} \cdot \vec{x})$ im Ortsraum, $\vec{\Delta k}$: Frequenzraum-Verschiebevektor) können die individuellen Komponenten dann so zusammengesetzt werden, dass sich ein hochauflösendes Bild ergibt. Dieses kann ggf. mit weiteren Dekonvolutionstechniken verarbeitet werden, um die Bildqualität weiter zu steigern.

Wie schon aus US-A-5 671 085 bekannt ist, ergibt die Beleuchtung des Objekts mit einem Muster aus möglichst hohen Raumfrequenzen eine Auflösungserhöhung gegenüber der herkömmlichen Lichtmikroskopie. Durch die erfindungsgemäße Ausnutzung eines nicht-linearen Zusammenhangs zwischen der Stärke eines Musters, z. B. Werten bestimmter Objektbedingungen, an einem Objektpunkt und der von diesem Objektpunkt ausgehenden (emittierten bzw. gestreuten) Lichtintensität ist es möglich, ein Bild mit einer noch höheren Ortsauflösung zu berechnen.

Ein Beispiel für die Bildung eines Musters von Objektbedingungen ist bei der Anregung von Fluoreszenz mit einer ortsabhängigen Verteilung intensiven Anregungslichts gegeben. Die nicht-lineare Abhängigkeit des vom Detektor erfassten Lichts kann z. B. durch die Sättigung der Anregung von im Objekt vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffen entstehen. Besitzt das Anregungslicht eine genügend hohe Intensität, so erhält man eine nicht-linearen Zusammenhang zwischen der eingestrahlten und der emittierten Lichtintensität am betrachteten Objekt (siehe z. B. D.R. Sandison et al. in „Handbook of Biological Confocal Microscopy“, Plenum Press, New York and London, 2. Auflage, 1995, Kapitel 3, Seiten 47 bis 50; und R.Y. Tsien et al. im genannten „Handbook of Biological Confocal Microscopy“, Kapitel 16). Das detektierte Licht enthält nun auch Informationen über Raumfrequenzen des Objekts, die sonst nicht zugänglich wären. Allerdings enthält jedes so aufgenommene Bild eine Mischung von Anteilen hoher Raumfrequenzen, die

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aber dann durch Aufnahme unter unterschiedlichen Bedingungen und Verrechnung mehrerer Teilbilder getrennt und zu einem konsistenten, hochauflösenden Bild zusammengesetzt werden können.

Das Gleichungssystem zur Trennung der Komponenten der Taylor-Entwicklung gemäß Gleichung (4) wird bspw. im Fall der Fluoreszenzmikroskopie bei Beleuchtung mit einer einem Liniengitter ähnlichen Struktur mit den folgenden Schritten ermittelt.

Die Intensitätsverteilung des Anregungslichts wird bei diesem Beispiel annähernd durch eine in den positiven Bereich verschobene Sinusfunktion beschrieben. Als Fouriertransformierte ergeben sich im Idealfall punktförmige Maxima bei

$\bar{k} = 0$, $\bar{k} = +\bar{k}_b$ und $\bar{k} = -\bar{k}_b$ (siehe Figur 1). Diese Maxima besitzen je nach Modulationsgrad eine bestimmte Energie und einen bestimmten Phasenwinkel in der komplexen Ebene, der von der Position bzw. der Verschiebung (Lage) des Musters des Anregungslichts abhängt. Durch den Einfluss der nicht-linearen Abhängigkeit der Fluoreszenzemission von der Anregungsintensität (Sättigung der Fluoreszenz) ergibt sich das in Figur 2 gezeigte Muster mit nieder- und höherfrequenten Komponenten im reziproken Raum, bspw. als Anregbarkeitsmuster für einen bestimmten Fluorophortyp.

Zur Rekonstruktion der Objektbildung genügt es, dass näherungsweise bei einem endlichen Raumfrequenzwert $\bar{k}_{\max} = \pm m\bar{k}_b$ abgebrochen wird und in der Rechnung nur Maxima mit kleineren Raumfrequenzen berücksichtigt werden.

Wird das Anregungslichtmuster gegenüber dem Objekt verschoben, so ändern sich die jeweiligen komplexen Phasenlagen der einzelnen punktförmigen Maxima im Fourieraum. Berücksichtigt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

man $\pm m$ Anregungs-Maxima und das Maximum bei $\vec{k} = 0$, so benötigt man $Z = 2m + 1$ unter verschiedenen Bedingungen aufgenommene Bilder, um die einzelnen durch das Mikroskop abgebildeten Komponenten des Objekts, die mit dem jeweiligen Maximum gefaltet (also verschoben) sind, separieren zu können (in Figur 2 ist nur eine Komponente dargestellt). Es kann z. B. vorgesehen sein, dass $Z = 5$ Maxima berücksichtigt werden. Der Phasenwinkel der Maxima im Frequenzraum des Anregungsmusters bewegt sich bei Verschiebung des Musters proportional zu $n|\vec{k}_b|$, da eine Verschiebung im Raum um $\vec{\Delta x}$ einer Multiplikation im Frequenzraum mit $\exp(i\vec{k}\vec{\Delta x})$ entspricht. Dabei entspricht n der Nummer des jeweiligen Raumfrequenzanteils (siehe Figur 2). Werden also verschiedene Bilder (Teilbilder) $I_n(\vec{k}) = F(I_n(\vec{x}))$ des Objekts mit jeweils um ein Fünftel des Grundmusters gegeneinander verschobener Phasenlage des Beleuchtungsmusters (also auch des Anregungsmusters) aufgenommen, so ergibt sich das folgende Gleichungssystem:

$$M \cdot \begin{pmatrix} \text{Obj}_0(\vec{k}) \\ \text{Obj}_{+1}(\vec{k}) \\ \text{Obj}_{-1}(\vec{k}) \\ \text{Obj}_{+2}(\vec{k}) \\ \text{Obj}_{-2}(\vec{k}) \end{pmatrix} = \text{const} \cdot \begin{pmatrix} I_0(\vec{k}) \\ I_1(\vec{k}) \\ I_2(\vec{k}) \\ I_3(\vec{k}) \\ I_4(\vec{k}) \end{pmatrix}$$

$$M = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp(i2\pi/5) & \exp(-i2\pi/5) & \exp(i4\pi/5) & \exp(-i4\pi/5) \\ 1 & \exp(i4\pi/5) & \exp(-i4\pi/5) & \exp(i8\pi/5) & \exp(-i8\pi/5) \\ 1 & \exp(i6\pi/5) & \exp(-i6\pi/5) & \exp(i12\pi/5) & \exp(-i12\pi/5) \\ 1 & \exp(i8\pi/5) & \exp(-i8\pi/5) & \exp(i16\pi/5) & \exp(-i16\pi/5) \end{bmatrix}$$

In diesem Gleichungssystem bezeichnen die $\text{Obj}_n(\vec{k})$ die zum n . Maximum des Anregungsmusters gehörenden, verschobenen kom-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

plexwertigen Komponenten des fouriertransformierten Objekts (Objekt-Raumfrequenz), die dann durch die OTF des abbildenden Systems transmittiert werden.

Die Lösung des Gleichungssystems liefert die individuellen Objektkomponenten, die zum jeweiligen Maximum des Anregungsmusters gehören. Die Lösung kann z. B. durch Invertieren der Matrix M erfolgen. Durch Multiplikation der inversen Matrix (M^{-1}) mit dem rechts stehenden Vektor der gemessenen Intensitäten $I_n(\vec{k})$ werden die individuellen transmittierenden Objektkomponenten ermittelt. Liegen mehr Messdaten vor als zur Lösung der Rekonstruktionsaufgabe nötig sind, so kann z. B. eine analoge, nicht quadratische oder rechteckige Matrix aufgestellt werden. Für die Berechnung der Lösung ist dann z. B. das Verfahren der pseudoinversen Matrix anwendbar, das es erlaubt, eine Lösung im Sinne der kleinsten Fehlerquote zu ermitteln.

Die Rechnung wird aufgrund der Linearität der Fouriertransformation vorzugsweise bildpunkt- oder pixelweise im Realraum ausgeführt.

Die komplexwertigen Komponenten $\text{Obj}_n(\vec{k})$ können nun um den Vektor $\vec{\Delta k}$ im Fourieraum (oder durch die o. g. entsprechende Multiplikation im Realraum) verschoben werden, so dass die jeweilige Raumfrequenz \vec{k} dort zu liegen kommt, wo sie bei musterfreier, gleichmäßiger Beleuchtung gemessen werden würde. $\vec{\Delta k}$ ist hier also $-\vec{n k}_0$.

In einem weiteren Schritt ist eine Korrektur der Komponenten $\text{Obj}_n(\vec{k})$ in ihrer komplexen Phasenlage je nach gegenseitiger Phasenlage ϕ_n der Frequenzraum-Anregungsmaxima im Bild I_0

THIS PAGE BLANK (USPTO)

vorgesehen (Multiplikation mit $\exp(-i\phi_n)$). Anschließend werden die Komponenten $\text{Obj}_n(\vec{k})$, ggf. durch eine gewichtete Addition, zu einem konsistenten Bild (der gewünschten Objektabbildung) vereinigt. Damit wird eine Ausdehnung des Trägers der Gesamt-OTF auf einen relativ zur linearen Abbildung deutlich vergrößerten Bereich und damit eine Erhöhung des Auflösungsvermögens ermöglicht.

Die illustrierte Verschiebung von Raumfrequenzkomponenten kann in verschiedenen Raumrichtungen durchgeführt werden. Dies kann nacheinander durch unterschiedliche Orientierung des Beleuchtungsmusters oder simultan durch Beleuchtung mit einer mehrdimensionalen Struktur erfolgen. Das Auflösungsvermögen ist in ein, zwei oder drei Dimensionen vergrößerbar. Die Gesamttransferfunktion kann im Anschluss daran oder bei Zwischenschritten noch durch entsprechendes Filtern und/oder Anwenden von an sich bekannten Entfaltungstechniken verändert werden.

Die Rekonstruktion der Objektabbildung ist nicht auf die beschriebene Lösung des Gleichungssystems mit der Matrix-Methode beschränkt. Alternativ können z. B. Quadratur-Techniken (analog zu WO 98/45745) oder algebraische bzw. iterative Rekonstruktionsverfahren (Maximum Likelihood/Expectation Maximization, Maximum Entropie, Algebraic Reconstruction und dergleichen) verwendet werden.

Die Erfindung ist nicht auf die nicht-lineare Anregung von Fluoreszenzemission beschränkt. Die Verfahrensweise ist entsprechend auch mit beliebig anderen Faktoren b_i implementierbar, die geeignet sind, allein für sich oder im Zusammenwirken untereinander, insbesondere im Zusammenwirken mit der Beleuchtungsintensität, die Intensität des vom Objekt ausgehenden Lichts zu beeinflussen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ausführungsbeispiele erfindungsgemäßer optischer Systeme

Ein erfindungsgemäßes optisches System ist in Figur 3 dargestellt. Die an sich bekannten Komponenten eines herkömmlichen Mikroskops sind mit gestrichelten Rahmen eingezeichnet. Das optische System 100 ist mit einer Beleuchtungseinrichtung 10, mindestens einem Mustergenerator 20, 20', 20'', einer Beleuchtungsoptik 30, einer Abbildungsoptik 50, einer Detektoreinrichtung 60 und einem Bildgenerator 70 aufgebaut. Das Bezugszeichen 40 bezieht sich auf die mit dem System 100 zu untersuchende Probe. Die Komponenten 10, 30, 50 und 60 können durch optische Bauteile bereitgestellt werden, wie sie aus der Lichtmikroskopie und aus der optischen Mess- und Analysetechnik, z. B. der Spektroskopie, bekannt sind. Anwendungsabhängig können die Komponenten 30 und/oder 50 entfallen oder durch ein gemeinsames Bauteil gebildet werden. Es kann auch vorgesehen sein, dass die Komponenten 20 und 30 durch ein gemeinsames optisches Bauteil gebildet werden.

Der Mustergenerator 20, 20' und/oder 20'' ist allgemein eine Einrichtung zur Bildung von Objektbedingungen mit einem vorbestimmten räumlichen Muster am Objekt 40. Anwendungsabhängig kann der Mustergenerator 20 eine Maske mit einer bestimmten ein- oder zweidimensionalen Übertragungscharakteristik entsprechend dem gewünschten Muster sein. Die Maske kann insbesondere durch ein Beugungsgitter (siehe Figur 4) (oder Phasengitter) oder eine Matrixanordnung aus einzeln ansteuerbaren Reflektor- oder Transmissionspixeln gebildet werden. Im letzteren Fall werden DMD-Einrichtungen („Digital Mirror Device“) bzw. LCD-Matrixanordnungen verwendet. Der Mustergenerator kann auch eine Spiegelanordnung zur Erzeugung eines Interferenzmusters (siehe Figur 5) oder eine Einrichtung zur unmittelbaren physikalischen oder chemischen Beeinflussung

THIS PAGE BLANK (USPTO)

des Objekts 40 (z. B. eine Heizeinrichtung oder einen Ultraschallgeber) umfassen. Abweichend von der Komponente 20 in Figur 3 kann der Mustergenerator auch zwischen der Beleuchtungsoptik 30 und dem Objekt 40 (Komponente 20'') oder unmittelbar am Objekt 40 vorgesehen sein (Komponente 20').

Der Bildgenerator enthält eine Einrichtung zur Rekonstruktion der Objektabbildung entsprechend den oben erläuterten Prinzipien. Als Bildgenerator kann ein speziell ausgelegter Schaltkreis oder auch ein entsprechend programmierter Computer verwendet werden. Der Bildgenerator kann zusätzlich Speicher-, Steuer- und/oder Anzeigekomponenten enthalten.

Figur 4 zeigt Einzelheiten eines erfindungsgemäßen optischen Systems am Beispiel eines Epifluoreszenzmikroskops 100. Die Beleuchtungseinrichtung 10 wird durch eine intensive Lichtquelle gebildet. Da zur Ausnutzung nicht-linearer Effekte hohe Lichtintensitäten benötigt werden, wird vorzugsweise eine gepulste Lichtquelle, wie z. B. ein Pulslaser oder eine Blitzlampe verwendet. Die Beleuchtungseinrichtung kann aber auch durch eine Hochdruckdampflampe (z. B. Quecksilberdampflampe) gebildet werden. Als Mustergenerator 20 (Maske) ist beispielhaft ein verstellbares und ggf. drehbares und/oder verschiebbares Beugungsgitter 22 vorgesehen, das entsprechend der Position 21 der Bildfeldblende in einer konjugierten Objektebene angeordnet ist. Das Beugungsgitter 22 ist ein Transmissionsgitter mit einem Gitterabstand von z. B. 30 μm . Das Beugungsgitter 22 ist an einem (nicht dargestellten) Stellantrieb angeordnet.

Die Beleuchtungsoptik 30 weist einen Anregungsfilter 31, einen dichroitischen Spiegel 32 zum Einkoppeln des Anregungslichts in eine Mikroskopsäule und Objektivlinsen 33. Am Ort des Objekts 40 wird ein Bild des Beugungsgitters 22 als Be-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

leuchtung für die zu untersuchende Probe in der entsprechenden Fokusebene gebildet. Die Abbildungsoptik 50 wird wiederum durch die Objektvlinsen 33, einen Emissionsfilter 51 und einer optional vorgesehenen Optik 52 zur Bildvergrößerung gebildet. Die Detektoreinrichtung 60 ist ein CCD-Detektor, von dem auf den (nicht dargestellten) Bildgenerator Daten übertragen werden.

Beim Aufbau gemäß Figur 4 kann das Beugungsgitter 22 durch eine DMD-Einrichtung oder eine LCD-Matrixanordnung ersetzt werden, die im Lichtweg zwischen der Beleuchtungseinrichtung 10 und dem Objekt 40 angeordnet ist. In diesem Fall ist zwischen den Komponenten 20 und 40 eine zusätzliche Verkleinerungsoptik vorgesehen. Eine DMD-Einrichtung umfaßt z. B. rd. $450 \cdot 600$ Reflektorelemente mit einer Pixelgröße von rd. $17 \cdot 17 \mu\text{m}^2$.

Für die erfindungsgemäße Aufnahme mehrerer Teilbilder mit unterschiedlichen Phasenlagen wird das Beugungsgitter 22 in kleinen Schritten gegenüber dem Objekt 40 verschoben. Die Schrittweite ist von der Strukturdimension der Maske und der Zahl der aufzunehmenden Teilbilder abhängig und beträgt z. B. bei $30 \mu\text{m}$ Strukturdimension und 7 Teilbildern $30/7 \mu\text{m}$). Alternativ kann auch bei einem feststehenden Beugungsgitter 22 eine Verschiebung des Objekts 40 vorgesehen sein, wobei dies jedoch zusätzliche Schritte der Bildkorrektur bei der Rekonstruktion der Objektabbildung erfordert. Alternativ ist es auch möglich, die Phase der verschiedenen Beugungsmaxima direkt durch geeignete optische Elemente zu beeinflussen. Die minimale Anzahl der für die Rekonstruktion des Gesamtbildes notwendigen Aufnahmen von Teilbildern ergibt sich durch die Anzahl der Unbekannten des zugehörigen Gleichungssystems (siehe oben). Es sind mindestens zwei Teilbildaufnahmen vorgesehen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Um die Auflösung in allen Raumrichtungen zu erhöhen, wird das Objekt 40 mit Mustern unter verschiedenen Winkeln nacheinander oder mit einer Maske wie bspw. mit der DMD- oder LCD-Einrichtung mit einem zweidimensionalen Muster, das Beugungsmaxima in mehreren Richtungen der Ebene hervorruft, in verschiedenen Phasenlagen in jeder Dimension beleuchtet.

Durch Erstellen von Fokussereien kann man noch zusätzliche Informationen über die axiale Struktur des Objekts gewinnen und damit dreidimensionale Objektabbildungen ableiten. Dies wird einerseits durch die inkohärente Lichtquelle und andererseits durch das Vorhandensein der Nullpunkt-Beugungsordnung des Gitters noch zusätzlich erleichtert. Ein weiterer Auflösungsgewinn kann durch Drehen des Objekts um eine auf der optischen Achse senkrecht stehende Achse unter dem optischen System erreicht werden.

Das Objekt 40 wird mit derart Momentanintensitäten beleuchtet bzw. angeregt, dass die Farbstoffe in der Probe gesättigt werden, so dass sich die gewünschten nicht-linearen Effekte zur Erhöhung des Auflösungsvermögens ergeben. Die gesuchten Anteile der sich überlagernden individuellen Ordnungen können aus den Bildern bei verschiedenen Phasenlagen der Anregungsstruktur errechnet werden. Es ist auch möglich, aus Aufnahmen von Teilbildern mit verschiedener Beleuchtungsintensität hoch auflösende Bilder zu rekonstruieren. Unterdrückt man (z. B. durch Ausblenden) die Nullpunkt-Beugungsordnung des Beugungsgitters 21, so erhöht man damit in vorteilhafter Weise den Modulationsgrad der Beleuchtungsfunktion und damit die relative Intensität in höheren Anregungsordnungen. Außerdem kann die Energie in höhere Raumfrequenzbereiche geschoben werden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Bei dem abgewandelten Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops 100 gemäß Figur 5 wird die Probe (das Objekt) 40 mit Laserlicht beleuchtet. Die Lichtquelle 10 ist vorzugsweise ein Pulslaser (z. B. mit einem optisch-parametrischen Oszillator, der mit einem frequenzverdreifachten NdYAG-Laser gepumpt ist, oder mit einem Ti-Saphir-Laser), kann aber auch durch eine andere genügend intensive Lichtquelle gebildet werden. Der Mustergenerator 20 wird durch eine Gruppe ebener Spiegel 23 - 27 gebildet, die dazu eingerichtet sind, das Anregungslicht von der Lichtquelle 10 auf verschiedene Strahlengänge zu zerlegen, die aus verschiedenen Richtungen auf das Objekt 40 treffen. Das Anregungslicht wird mit dem teildurchlässigen Spiegel 23 und die voll reflektierenden Spiegel 25 - 27 von zwei entgegengesetzten Seiten auf das Objekt 40 gerichtet. Optional kann der zweite teildurchlässige Spiegel 24 vorgesehen sein, um einen dritten Anregungslichtweg zum Objekt 40 zu bilden. Es ergeben sich drei miteinander interferierende Anregungs-Lichtstrahlen, die eine Verwendung des Mikroskops 100 in der höchstaauflösenden 3D-Mikroskopie erlauben. Für zweidimensionale Anwendungen kann auf den Spiegel 24 verzichtet werden. Die Strahlen interferieren über einen Bereich der in der Größenordnung der Kohärenzlänge der Lichtquelle 10 liegt.

Zur Veränderung der Objektbedingungen (Interferenzmuster am Objekt 40) zur Aufnahme verschiedener Teilbilder sind mindestens zwei Spiegel verschiebbar angeordnet. Bspw. ist vorgesehen, dass die Spiegel 24 und 25 zur Änderung des Interferenzmusters verschiebbar sind. Alternativ ist zur Veränderung der Objektbedingungen mindestens ein elektrooptisches Element zur Änderung der Phasenlage des Beleuchtungslichts in einem der Teil-Lichtwege vorgesehen.

Die Beleuchtungsoptik 30 ist in Figur 5 aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt, kann aber ggf. bauformabhän-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gig ohnehin weggelassen werden. Die Abbildungsoptik 50 umfasst die Objektivlinsen 53, den Emissionsfilter zur Absorption des Anregungslichts 51 und optional eine Optik 52 zur Bildvergrößerung. Als Detektor ist wiederum ein CCD-Detektor 60 vorgesehen.

Um ein gute axiale Diskriminierung zu erhalten, kann das Anregungslicht zugleich noch aus einer oder mehreren Richtungen durch das (nicht dargestellte) Objektiv und/oder von der dem Objektiv abgewandten Seite auf das Objekt 40 fallen, das sich im Differenzbereich der Anregungslichtstrahlen (kreuz schraffierte Region) befindet. Die durch Nicht-Linearitäten erzielbare zusätzlich Auflösungserhöhung kann wiederum durch Benutzung entsprechend starker Laser bzw. gepulster Laser mit hohen Momentanintensitäten erreicht werden. Auch die Verwendung anderer intensiver Lichtquellen (z. B. Blitzlicht) ist möglich und ggf. vorteilhaft.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden mehrere Teilbilder jeweils mit verschiedenen Interferenzmustern am Objekt 40 aufgenommen und nach den oben erläuterten Prinzipien zur Gewinnung der Objektabbildung verarbeitet.

Die erläuterten Ausführungsbeispiele basieren auf der Ausnutzung der nicht-linearen Abhängigkeit des erfassten Lichtes von der Intensität des Anregungslichts durch Sättigung von Fluoreszenzfarbstoffen. Alternative nicht-lineare Effekte sind durch die Sättigung der Absorption von Anregungslicht unter intensiver Beleuchtung, die Abhängigkeit der Phase des emittierten oder gestreuten Lichts von der im Objekt vorhandenen Beleuchtungsintensität, die sich im Detektor (z. B. über Interferenz) oder vor diesem in einer nicht-linearen Intensitätsabhängigkeit umsetzt, SHG- oder THG-Prozesse, eine Abhängigkeit der Lichteigenschaften der Ramanstreuung vom

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Wert einer oder mehrerer Objektbedingungen, zeitlich kohärente Effekte (z. B. Rabi-Oszillationen) an Atomen oder Molekülen im Objekt, CARS-Prozesse, Mehrphotonen-Absorptionen, stimulierte Emissionen im Objekt, die Besetzung langlebiger Anregungszustände oder chemisch veränderter Zustände in den Fluorophoren vor oder während der Beleuchtung, strahlungslose Energietransferprozesse und/oder physikalische oder chemische Objektbedingungen gegeben.

Insbesondere zur Ausnutzung zeitlich kohärenter Effekte (Rabi-Oszillationen) an Atomen oder Molekülen oder Fluorophoren im Objekt (in Lösung, in Festkörpern, in Gasen oder auch unter Vakuumbedingungen) werden vorzugsweise Beleuchtungseinrichtungen mit extrem kurzen Pulslängen (z. B. < 100 fs) verwendet. Basiert der nicht-lineare Effekt auf der stimulierten Emission so wird diese gleichzeitig oder in zeitlicher Abfolge induziert. Die stimulierte Emission kann bei der selben Wellenlänge wie der des Anregungslichts oder auch bei anderen Wellenlängen, z. B. bei einer typischen Fluoreszenzwellenlänge, induziert werden. Die Ausnutzung von Energietransferprozessen bedeutet, dass Energie der Anregungsstrahlung stahlend oder strahlungslos von Fluorophoren auf benachbarte Fluorophor-Moleküle übertragen wird und dadurch eine multi-lineare Abhängigkeit der emittierten Lichtintensität von der am Nachbarort eingestrahlten Intensität entsteht.

Zu den physikalischen oder chemischen Änderungen der Objektbedingungen zählt insbesondere die Ausnutzung der nicht-linearen Abhängigkeit des von den Objektpunkten ausgehenden Lichts von einem räumlich inhomogenen elektrischen oder magnetischen Feld oder vom am Objektpunkt herrschenden Druck, Scherkräften oder mechanischen Spannungsverhältnissen. Es kann auch ein am Objekt gebildeter Temperaturgradient entsprechend einem bestimmten Muster vorgesehen sein, der die

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gewünschte multi-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt ausgehenden Lichts von der jeweils herrschenden Temperatur herstellt. Es kann auch eine multi-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt ausgehenden Lichts von den dort herrschenden chemischen Bedingungen (z. B. pH-Wert) verwendet werden. Zusätzlich kann eine Objektbestrahlung mit Radiowellen, Mikrowellen, Infrarotlicht, Röntgenstrahlung oder auch Schallwellen oder Ultraschallwellen ausgenutzt werden.

Zur Realisierung der genannten Effekte ist der Mustergenerator entsprechend angepasst. Bspw. kann der Mustergenerator eine zusätzliche Bestrahlungseinrichtung umfassen, deren Emission auf das Objekt fokussiert ist.

Die Figuren 6 und 7 illustrieren Simulationsergebnisse zum Einsatz eines Fluoreszenzmikroskops gemäß Figur 4. Die Lichtintensität ist hier als Schwärzung dargestellt. Aus drucktechnischen Gründen ist die Bildqualität eingeschränkt. Zur besseren Sichtbarmachung der Beleuchtung wurde im Objekt (Figur 6a, 7a) eine konstante Hintergrundfluoreszenz angenommen. Figur 6a zeigt das simulierte Objekt, dessen Beleuchtung mit dem beschriebenen Verfahren und Abbildung mit einem Epifluoreszenzmikroskop simuliert wurde. Die Teilbilder b-h repräsentieren Simulationen von jeweils mit verschiedenen Phasen des beleuchtenden Streifenmusters aufgenommenen Teilbildern. Figur 6i zeigt ein Beispiel, bei dem auch die Richtung des beleuchtenden Musters verändert wurde. Die Anregungsintensität war bei diesen Simulationen um den Faktor 5 größer als die Sättigungsintensität. Die maximal erwartete Photonenzahl betrug 560 Photonen/Pixel in den Einzelbildern. Figur 7 zeigt die zugehörigen Rekonstruktionsergebnisse. Figur 7a wiederholt das Originalbild der Simulation. Nach Faltung mit der Punktbildfunktion eines simulierten Mikroskops und einer Poisson-verteilten Verrauschung (Max = 560 Photonen) ergibt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

sich das Bild Figur 7b. Die erfindungsgemäße Rekonstruktion aus Teilbildern, die analog zu den Figuren 6b bis 6h mit Beleuchtungsmustern unter 3 Drehwinkeln simuliert wurden, ist in Figur 7c gezeigt. Dabei ist keine Verstärkung hoher Raumfrequenzen vorgenommen wurden. Erfolgt zusätzlich die dem System eigene Hochfrequenzverstärkung, so ergibt sich aus Figur 7c das Bild gemäß Figur 7e. Die Anwendung einer entsprechenden Hochfrequenzverstärkung bei dem (konventionellen) Bild gemäß Figur 7b würde lediglich ein Bild mit gemäß Figur 7d ergeben. Der Vergleich der Bilder Figur 7e und Figur 7d zeigt die Überlegenheit des erfindungsgemäßen Verfahrens der Rekonstruktion hoher Raumfrequenzen aus der Aufnahme mehrerer Teilbilder. Figur 7f illustriert den zugehörigen simulierten Träger der mit dem Verfahren erreichten OTF bei einer berücksichtigten Anzahl von $Z = 7$ Maxima.

Figur 8 illustriert die Verbesserung des Auflösungsvermögens mit dem erfindungsgemäßen Verfahren. Es ist die Intensität auf einer Bezugslinie entlang der zweiten senkrechten Spalte in der Punktmatrix (links oben im Originalbild) in den Figuren 7d und 7e dargestellt. Die durchgezogene Linie entspricht dem Ergebnis des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Einzelpunkte sind deutlich als Maxima erkennbar. Mit dem herkömmlichen Verfahren (Epifluoreszenz mit nachfolgender Hochfrequenzverstärkung) ist nur der erste Punkt (teilweise) und ein Maximum zwischen den beiden untersten Punkten erkennbar. Bei der simulierten Abbildung eines Punktes ergibt sich eine Verbesserung des Auflösungsvermögens um einen Faktor von mehr als 3.

Figur 9 zeigt einen lateralen Schnitt durch die simulierte effektive optische Transferfunktion des Gesamtsystems gemäß Figur 4. Der Gitterabstand des Beugungsgitters wurde hier so gewählt, dass nur die Beugungsordnungen 0, +1 und -1 des Beu-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gungsgitters durch das Objektiv übertragen werden können. Durch die teilweise Sättigung der beteiligten Farbstoffe ergibt sich eine nicht-lineare Beziehung zwischen der Anregungsintensität und der Wahrscheinlichkeit der Anregung eines Farbstoffmoleküls an einem Punkt im Objektraum. Diese räumlich variierende Anregungswahrscheinlichkeit wird auch als Anregungsmuster bezeichnet. Wenn man annimmt, dass die Anregungswahrscheinlichkeit für ein bestimmtes Farbstoffmolekül eine Funktion der Anregungsintensität ist, so führt eine Nicht-Linearität dieser Funktion dazu, dass im Emissionsmuster auch räumlich höhere Harmonische des Anregungsmusters auftreten. Maxima im reziproken Raum, die jenseits der durch die Abbe-Grenze gegebenen Raumfrequenzbegrenzung liegen, können dann im Anregungsmuster auftreten. Die raumfrequenzbegrenzte Abbildung der Multiplikation der Farbstoffverteilung mit dem Anregungsmuster enthält nun Komponenten analog zu einer linearen Anregung mit einem Muster, welches höhere Raumfrequenzen enthält.

In Figur 9 ist im Einzelnen zu erkennen, dass die Transferfunktion bei einer herkömmlichen Abbildung mit einem Mikroskopobjektiv (mit nachfolgender Anwendung einer Hochfrequenzverstärkung) entsprechend der durchgezogenen Linie relativ schmal ist, wohingegen die Transferfunktion bei Anwendung der gesättigten Beleuchtung (mit einer Hochfrequenzverstärkung) erheblich erweitert wird (gestrichelt gezeichnet).

Figur 10 zeigt eine simulierte Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens auf ein mittels Elektronenmikroskopie aufgenommenes Schnittbild des Zellkerns einer embryonalen Bovinzelle. Figur 10a illustriert den invertierten elektronenmikroskopischen Ausschnitt nahe der Kernhülle mit der Kernmatrix („Nuclear Matrix“). Die simulierte epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit Entfaltung ergibt das in Figur

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10b gezeigt herkömmliche Bild. Bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ergibt sich das in Figur 10c gezeigte Bild. Das mit der Methode der gesättigten lateralen Modulation aufgenommene und ausgewertete und anschließend entfaltete Bild (Maximum: 560 Photonen im Einzelbild) ist gegenüber dem herkömmlichen Bild deutlich verbessert und mit dem elektronenmikroskopischen Originalbild vergleichbar.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Zeichnungen und den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung einer Objektabbildung mindestens eines Objekts (40), wobei mindestens zwei Teilbilder des Objekts (40) unter jeweils verschiedenen Objektbedingungen aufgenommen werden, die am Objekt mit räumlichen Mustern ausgebildet sind, wobei jeweils für einen Objektpunkt eine nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt her detektierten Lichtes von den am Objektpunkt gegebenen Objektbedingungen besteht und die Teilbilder unterschiedliche Beträge verschiedener Raumfrequenzanteile der Objektstruktur enthalten, und aus den Teilbildern durch Rekonstruktion der Raumfrequenzanteile die gewünschte Objektabbildung ermittelt wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem räumliche Muster mindestens einer Objektbedingung gebildet werden, für die jeweils die nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt ausgehenden und detektierten Lichtes besteht.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem räumliche Muster von mindestens zwei Objektbedingungen gebildet werden, für die eine Abhängigkeit des detektierten Lichtes von einer multiplikativen Verknüpfung der Objekteigenschaften und eine lineare oder eine nicht-lineare Abhängigkeit des detektierten Lichtes von jeder der Objektbedingungen besteht.
4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das räumliche Muster durch ein Muster einer Beleuchtungsintensität am Objekt (40) gegeben ist und das Objekt (40) mit dem Muster der Beleuchtungsintensität so beleuchtet wird, dass eine nicht-lineare Abhängigkeit der an einer Detek-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

toreinrichtung (60) erfassten, von einem Objektpunkt ausgehenden Lichtintensität zu der an diesem Objektpunkt gegebenen Beleuchtungsintensität besteht.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die nicht-lineare Abhängigkeit des erfassten Lichts durch eine Sättigung von Fluoreszenzlicht von Fluorophoren unter intensiver Beleuchtung, eine Sättigung der Absorption von Beleuchtungslicht unter intensiver Beleuchtung, eine Abhängigkeit der Phase des emittierten oder gestreuten Lichtes von der im Objekt vorhandenen Beleuchtungsintensität, SHG- oder THG-Prozesse, eine Abhängigkeit der Lichteigenschaften der Ramanstreuung vom Wert einer oder mehrerer Objekteigenschaften, zeitlich kohärente Effekte an Atomen oder Molekülen im Objekt (40), eine Mehrphotonenabsorption, CARS-Prozesse, eine stimulierte Emission, eine Besetzung langlebiger Zustände oder chemisch veränderter Zustände, strahlende oder strahlungslose Energietransferprozesse von Fluorophoren auf benachbarte Fluorophore, am Objektpunkt gegebene räumlich inhomogene elektrische oder magnetische Felder, am Objektpunkt gegebene Drucke, Scherkräfte oder mechanische Spannungsverhältnisse, am Objektpunkt gegebene Temperaturen, am Objektpunkt gegebene chemische Verhältnisse und/oder zusätzliche Objektbestrahlungen mit elektromagnetischen Strahlen oder Schallwellen gebildet wird.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das räumliche Muster einer Objektbedingung im reziproken Raum durch eine Anzahl von Punkten, die in einer, zwei oder drei Dimensionen verteilt sind, beschrieben oder annähernd beschrieben werden kann bzw. im Ortsraum räumlich periodisch oder näherungsweise periodisch in einen oder mehreren Dimensionen gebildet wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem zur Einstellung verschiedener Objektbedingungen das Objekt und das räumliche Muster in einer oder mehreren Richtungen relativ zueinander verschoben werden.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, bei dem das Muster durch eine Maske oder durch Interferenz erzeugt wird und eine Verschiebung des Musters durch Verschiebung der Phase verschiedener Beugungsmaxima erzielt wird.

9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Objektbedingungen entsprechend einer vorbestimmten zeitlichen Struktur verändert und die Teilbilder zu unterschiedlichen Zeiten aufgenommen werden.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, bei dem zur Erzeugung verschiedener Objektbedingungen die Beleuchtungsintensität variiert wird.

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Rekonstruktion der Objektabbildung aus den Teilbildern durch Lösung eines Gleichungssystems unter Berücksichtigung der nicht-linearen Abhängigkeiten oder durch eine iterative Verfahrensweise erfolgt.

12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Position des Objekts oder eines oder mehrerer Teilobjekte des Objekts (40) ermittelt werden.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Rekonstruktion der Objektabbildung unter Berücksich-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tigung einer vorbekannten Struktur des Objekts (40) oder von Teilen des Objekts (40) erfolgt.

14. Optisches Abbildungssystem (100) mit einer Beleuchtungseinrichtung (10) und einer Detektoreinrichtung (60), die dazu eingerichtet sind, ein Objekt (40) zu beleuchten bzw. eine Abbildung des Objekts (40) oder von Teilen des Objekts (40) aufzunehmen,

gekennzeichnet durch

mindestens einen Mustergenerator (20, 20', 20'') zur Erzeugung mindestens eines veränderlichen räumlichen Musters von Objektbedingungen am Objekt (40), wobei die Beleuchtungseinrichtung (10) und/oder der Mustergenerator (20, 20', 20'') dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das mit der Detektoreinrichtung (60) detektierbare Licht nicht-linear abhängig ist, und einen Bildgenerator (70) zur Rekonstruktion einer Objektabbildung aus Teilbildern, die mit der Detektoreinrichtung (60) aufgenommen worden sind.

15. Optisches System gemäß Anspruch 14, bei dem der Mustergenerator (20, 20', 20'') eine Maske umfasst, mit der auf dem Objekt (40) ein räumliches Muster einer Beleuchtungsintensität gebildet werden kann.

16. Optisches System gemäß Anspruch 15, bei dem die Maske ein mehrdimensionales Beugungsgitter (22), ein Phasengitter, eine DMD-Einrichtung oder eine LCD-Matrix umfasst.

17. Vorrichtung gemäß Anspruch 15 oder 16, bei dem die Maske und die Probe (40) relativ zueinander verschiebbar und/oder drehbar angeordnet sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18. Optisches System gemäß Anspruch 14, bei dem der Muster-generator (20, 20', 20'') eine Spiegelanordnung (23 - 27) umfasst, die zur Erzeugung eines Interferenzmusters auf dem Objekt (40) eingerichtet ist.

19. Optisches System gemäß Anspruch 14, bei dem der Muster-generator (20, 20', 20'') eine Einrichtung zur Einstellung vorbestimmter physikalischer oder chemischer Bedingungen am Objekt (40) entsprechend dem räumlichen Muster umfasst.

20. Optisches System gemäß Anspruch 14, bei dem eine Verstelleinrichtung zu Verschiebung des Objekts (40) im räumlichen Muster der Objektbedingungen vorgesehen ist.

21. Optisches System gemäß einem der Ansprüche 14 bis 20, bei dem die Beleuchtungseinrichtung (10) eine Blitzlampe, einen Laser oder eine Hochdrucklampe umfasst.

22. Optisches System gemäß einem der Ansprüche 14 bis 21, bei dem eine Beleuchtungsoptik (30) und/oder eine Abbildungsoptik (50) vorgesehen sind.

23. Verwendung eines Verfahrens oder eines optischen Systems gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Kombination mit herkömmlichen optischen Mikroskopieverfahren, insbesondere in Kombination mit der Standard-Fernfeldmikroskopie, der Epifluoreszenzmikroskopie, der Konfokalmikroskopie, der 4Pi-Mikroskopie, der Theta-Mikroskopie, der Nahfeldmikroskopie, mikroskopischen I^2M -, I^3M - und I^5M -Verfahren, STED-Verfahren, Multiphotonenmikroskopie, CARS-Verfahren und SHG- oder THG-Mikroskopie.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Gewinnung einer Objektabbildung mindestens eines Objekts (40) beschrieben, wobei mindestens zwei Teilbilder des Objekts (40) unter jeweils verschiedenen Objektbedingungen aufgenommen werden, die am Objekt mit räumlichen Mustern ausgebildet sind, wobei jeweils für einen Objektpunkt eine nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt her detektierten Lichtes von den am Objektpunkt gegebenen Objektbedingungen besteht und die Teilbilder unterschiedliche Beträge verschiedener Raumfrequenzanteile der Objektstruktur enthalten, und aus den Teilbildern durch Rekonstruktion der Raumfrequenzanteile die gewünschte Objektabbildung ermittelt wird. Es werden auch optische Systeme zur Umsetzung eines derartigen Verfahrens beschrieben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

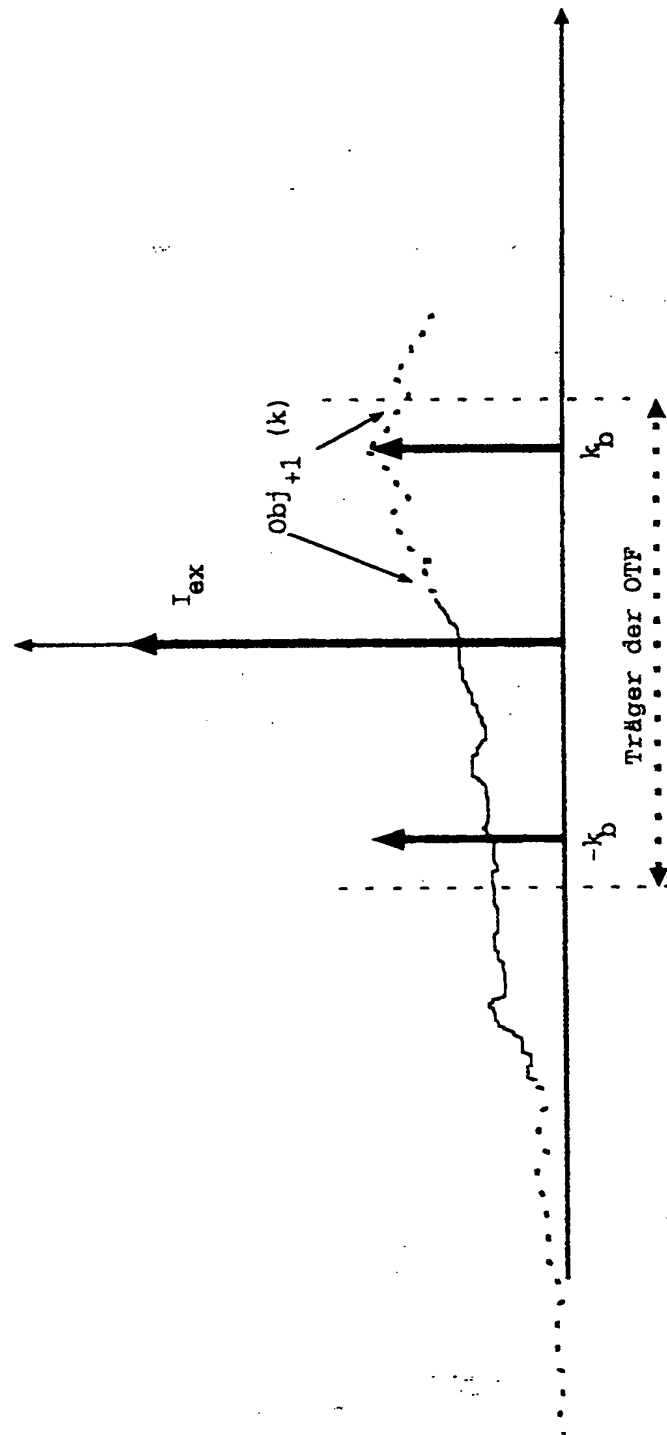


Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

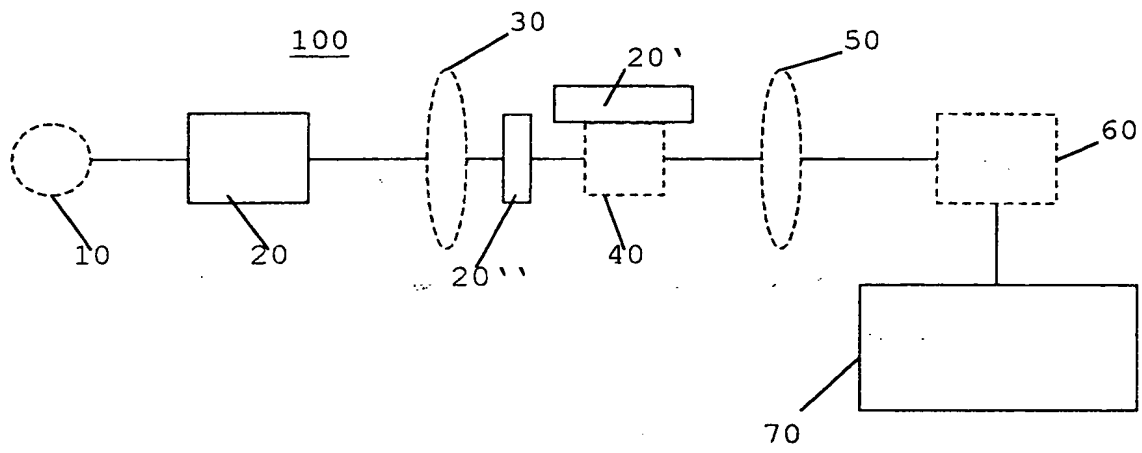


Fig. 3

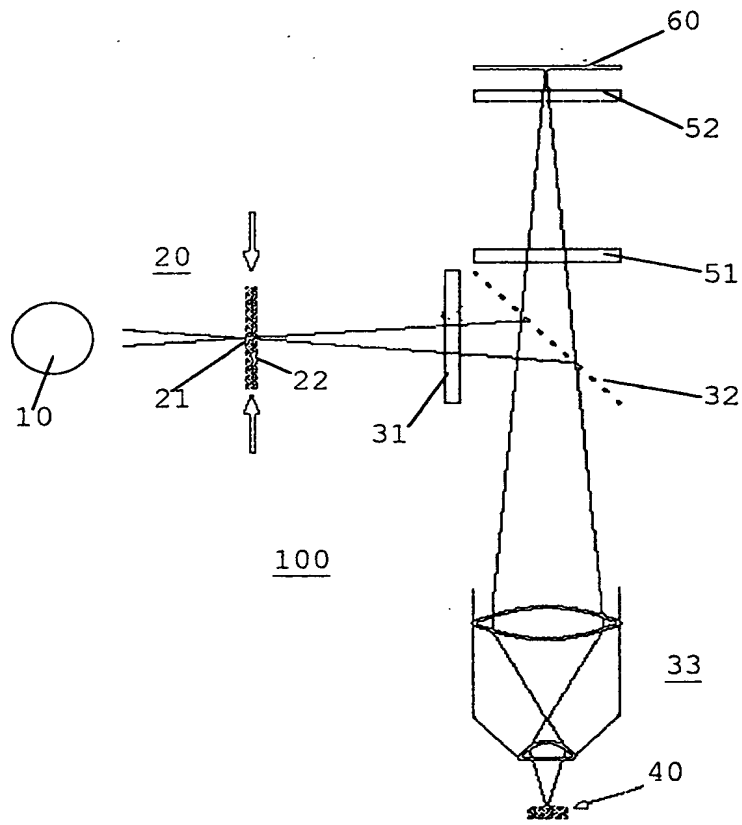


Fig. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

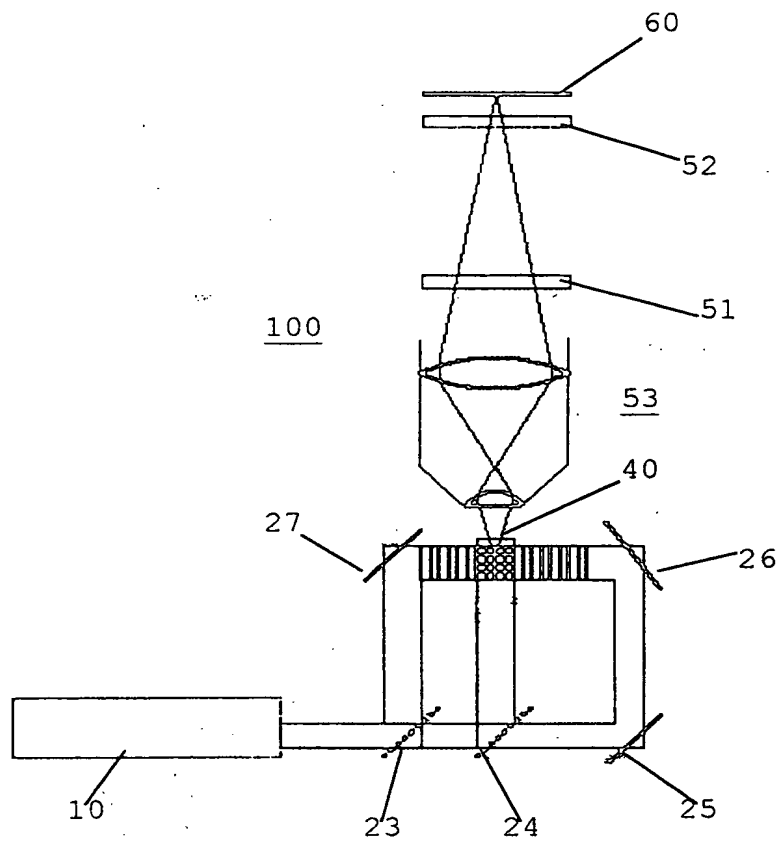


Fig. 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

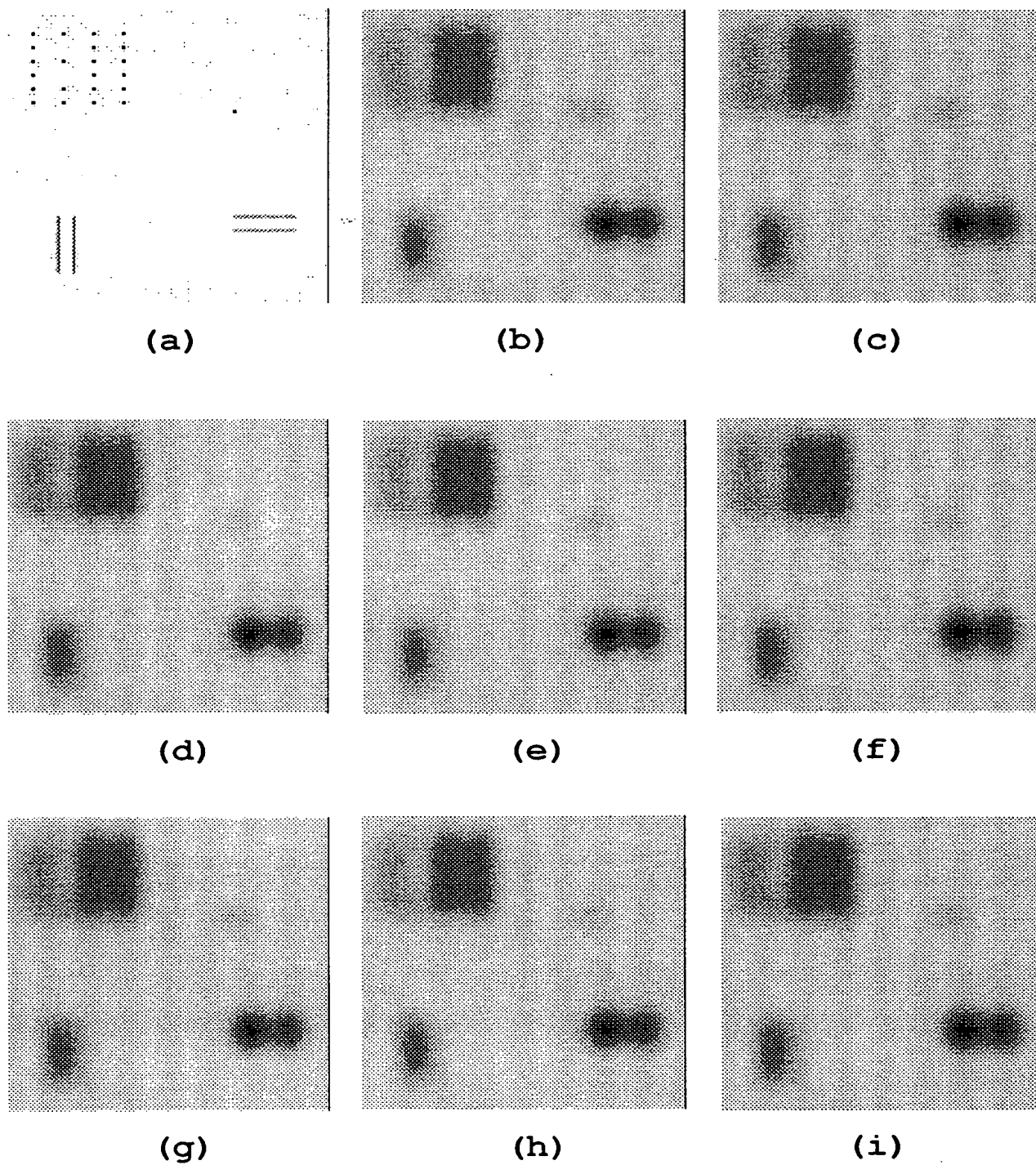
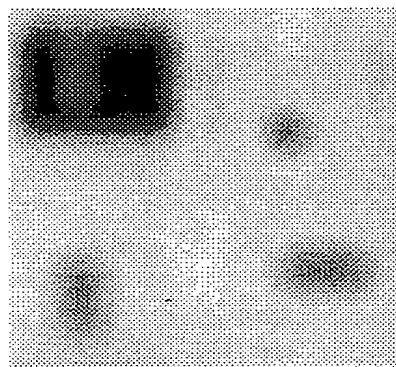


Fig. 6

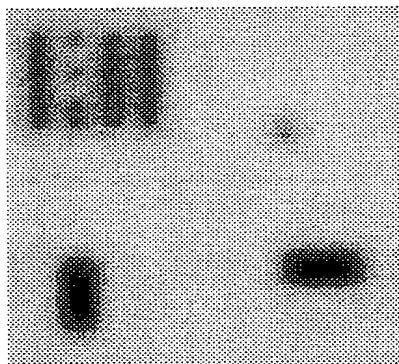
THIS PAGE BLANK (USPTO)



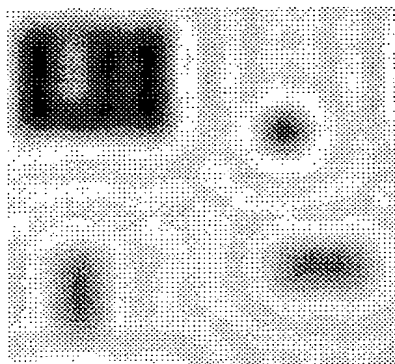
(a)



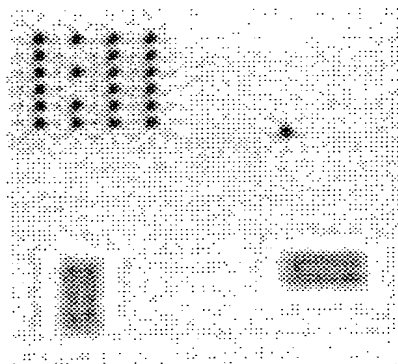
(b)



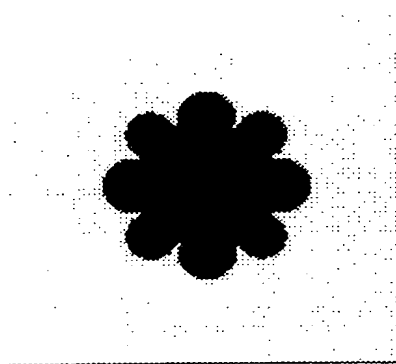
(c)



(d)



(e)



(f)

Fig. 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

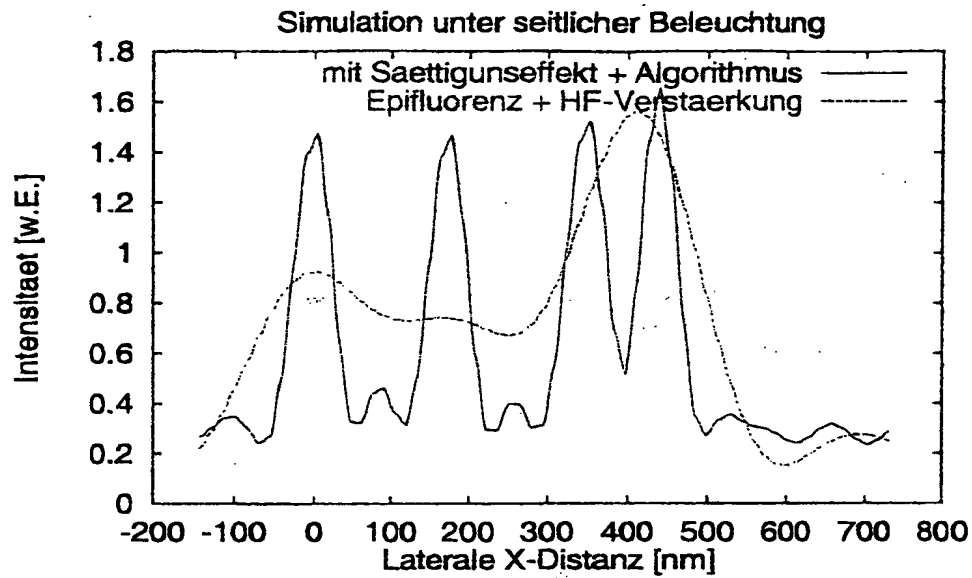


Fig. 8

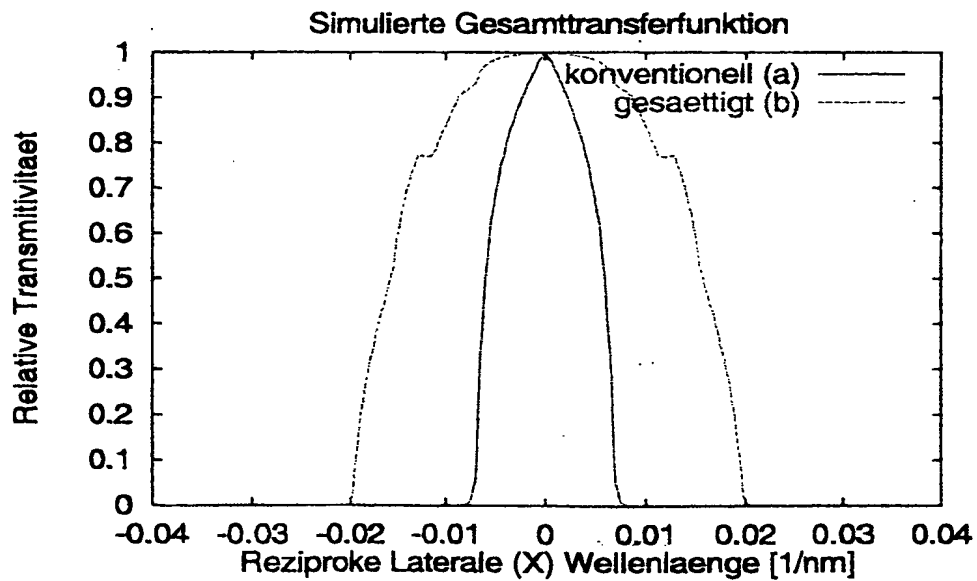
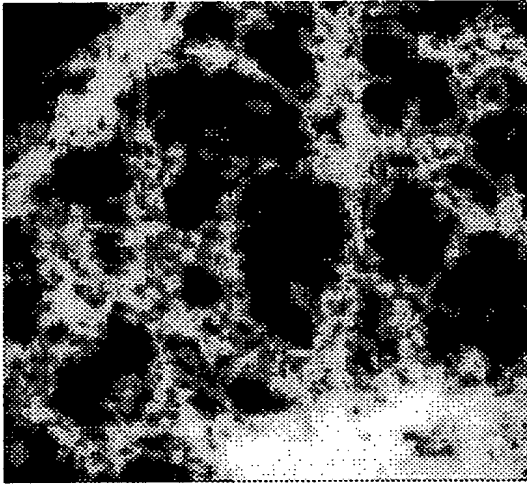
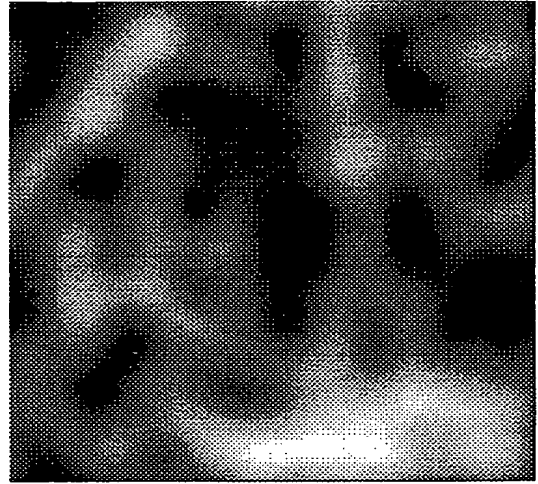


Fig. 9

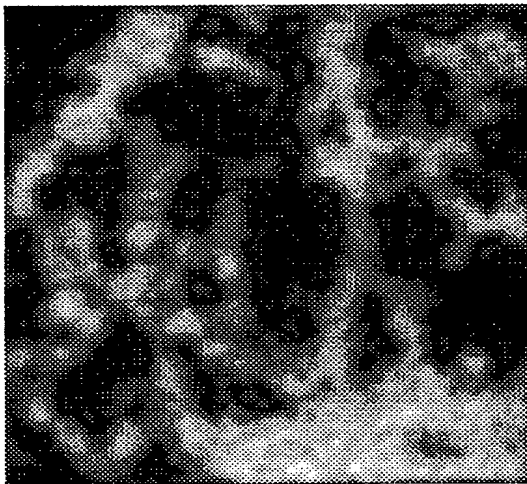
THIS PAGE BLANK (USPTO)



(a)



(b)



(c)

Fig. 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

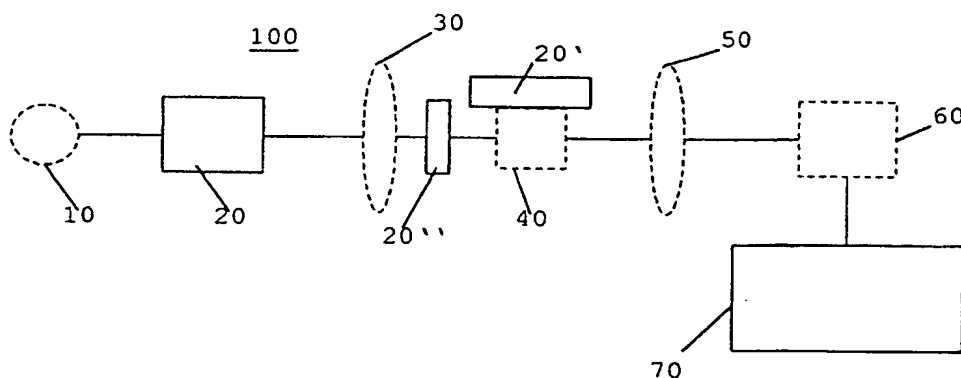

 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro

 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G02B 21/00, G01N 21/17, 21/62, G06T 7/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/52512 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. September 2000 (08.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01806 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. März 2000 (02.03.00) (30) Prioritätsdaten: 199 08 883.7 2. März 1999 (02.03.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 8, D-80539 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINTZMANN, Rainer [DE/DE]; Stumpfe Eiche 11, D-37077 Göttingen (DE). CREMER, Christoph [DE/DE]; Mombertplatz 23, D-69126 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, D-80799 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR REPRESENTING AN OBJECT

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR OBJEKTTABBILDUNG



(57) Abstract

The invention relates to a method for obtaining an object image of at least one object (40), whereby at least two partial images of the object (40) are recorded under different conditions for each image. Said conditions take the form of spatial patterns on the object, whereby for each point on the object there is a non-linear dependency of the light which is detected from the direction of said object point on the object conditions which exist at said point on the object and whereby the partial images contain varying amounts of different space frequency components of the object structure. The desired object image is determined from the partial images by reconstructing the share of space frequency components. The invention also describes optical systems (100) for implementing such a method.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Gewinnung einer Objektabbildung mindestens eines Objekts (40) beschrieben, wobei mindestens zwei Teilbilder des Objekts (40) unter jeweils verschiedenen Objektbedingungen aufgenommen werden, die am Objekt mit räumlichen Mustern ausgebildet sind, wobei jeweils für einen Objektpunkt eine nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt her detektierten Lichtes von den am Objektpunkt gegebenen Objektbedingungen besteht und die Teilbilder unterschiedliche Beträge verschiedener Raumfrequenzanteile der Objektstruktur enthalten, und aus den Teilbildern durch Rekonstruktion der Raumfrequenzanteile die gewünschte Objektabbildung ermittelt wird. Es werden auch optische Systeme (100) zur Umsetzung eines derartigen Verfahrens beschrieben.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Vorrichtung zur Objektabbildung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Objektabbildung mit hohem räumlichen Auflösungsvermögen, insbesondere ein lichtmikroskopisches Abbildungsverfahren, und Vorrichtungen zur Durchführung eines derartigen Verfahrens.

Das Auflösungsvermögen optischer Abbildungssysteme wird oft entscheidend durch die objektseitige Apertur einer Objektlinse und deren Brechzahl bestimmt. Von einem Objekt ausgehendes Licht kann nur erfasst werden, wenn es innerhalb des Akzeptanzwinkels des Objektivs auf dieses trifft. Je höher das Auflösungsvermögen ist, desto höhere Orts- oder Raumfrequenzen der abzubildenden Objektstruktur können erfasst werden. Die Erfassung der Raumfrequenzen wird durch die lichtoptische Transferfunktion oder Modulationsübertragungsfunktion (im Folgenden: OTF) des optischen Systems beschrieben. Die OTF gibt an, welche Raumfrequenzen, aus denen sich das Objekt mittels Fouriertransformation zusammengesetzt konstruieren lässt, bei der optischen Abbildung erhalten bleiben, bzw. wie Raumfrequenzanteile geschwächt werden. Das Auflösungsvermögen des optischen Systems (z. B. eines Lichtmikroskops) ist durch den Bereich bestimmt, in dem die OTF des Systems nicht verschwindet. Verschwindet die OTF in Abschnitten des reziproken Raumes vollständig, so ist es unmöglich, ohne zusätzliche Annahmen über die Objektstruktur (z. B. räumliche Beschränktheit, Positivität) die entsprechenden Raumfrequenzen in einer Objektabbildung zu rekonstruieren. Es besteht allgemein ein Interesse an der Ausdehnung der OTF auf einen möglichst großen Bereich im reziproken Raum, um die Auflösung des optischen Systems zu erhöhen.

Herkömmliche Verfahren zur Erhöhung des Auflösungsvermögens sind insbesondere auf eine geeignete Wahl der Objektbeleuchtung gerichtet. So wird bspw. beim konfokalen Mikroskop mit einem fokussierten Lichtstrahl das Objekt von einer Seite möglichst punktweise beleuchtet und gleichzeitig abgetastet (gescannt), wobei oft die Detektion mittels einer Blende auf einen kleinen Bereich des Objekts begrenzt wird (siehe z. B. US-A 4 631 581).

Bei dem in EP 0 491 289 beschriebenen 4Pi-Mikroskop wird von beiden Objektseiten kohärent beleuchtet und je nach Ausführung auch detektiert. Beim Wellenfeldmikroskop wird üblicherweise mit kohärenten ebenen Lichtwellen von gegenüberliegenden Seiten beleuchtet (siehe z. B. US-A 4 621 911; F. Lanny et al. in „Bioimaging“, Band 1, 1993, Seite 187 ff.; US-A 5 801 881). Beim I⁵M-Mikroskop wird sowohl kohärent von beiden Seiten beleuchtet, als auch kohärent detektiert, indem die beiden Bilder des Objekts auf einem ortsauflösenden Detektor zur Interferenz gebracht werden (siehe US-A 5 671 085; M.G.L. Gustafsson et al. in „Proceedings of SPIE“, Band 2655, 1996, Seite 62 ff.). Von E.H.K. Stelzer et al. in „Opt. Commun“ Band 111, 1994, Seite 536 ff. und S. Lindeck et al. in „Handbook of Biological Confocal Microscopy“, Herausgeber J.B. Pawley, Plenum Press, New York 1995, Kapitel 26, Seite 417 ff. wird ein Theta-Mikroskop beschrieben, bei dem Licht von drei Seiten detektiert wird, wobei mit konfokaler oder 4Pi-ähnlicher Beleuchtung gearbeitet wird. Da bei der seitlichen Detektion in der Objektebene die Auflösung entlang der optischen Achse der Beleuchtung besonders groß ist, erhält man insgesamt ein verkleinertes Fokusvolumen.

Es ist auch bekannt, in stereomikroskopischen Oberflächentopographie-Verfahren eine räumlich variierende Beleuchtung (z.

B. sinus-förmig variierend) zu verwenden. Durch Verrechnung der gemessenen Bilder kann auf die Oberflächenstruktur des Objekts rückgeschlossen werden (siehe z. B. US-A 4 525 858; R. Windecker et al. in „Optical Engineering“, Band 36, 1997, Seite 3372 ff.).

Ein Verfahren zur hochauflösenden dreidimensionalen Bildgebung durch Erfassung optischer Schnitte des Objekts ähnlich zur konfokalen Mikroskopie ist in WO 97/31282 beschrieben. Es basiert auf der Aufnahme mehrerer Bilder mit jeweils unterschiedlichen Mustern aus Beleuchtungslochblenden und zugehörigen Detektionslochblenden. Durch geeignete Rekonstruktionsverfahren lässt sich aus den aufgenommenen Daten ein Bild berechnen, das dem eines konfokalen Mikroskops äquivalent ist. Dieses Verfahren wird auch als „Aperture Correlation Microscopy“ bezeichnet (siehe auch R. Juskaitis et al. in „Nature“ Band 383, 1996, Seite 804 ff., T. Wilson et al. in „Proceedings of the SPIE“, Band 2984, 1997, Seite 21 ff.). Aus WO 98/45745 ist ein Verfahren bekannt, das auf der Beleuchtung unter Abbildung eines Beugungsgitters oder mit zwei interferierenden Laserstrahlen beruht (siehe auch T. Wilson et al. in „Cell Vision“, Band 4, 1997, Seite 231 ff.). In der Publikation von R. Heintzmann et al. in „Proceedings of SPIE“ Band 3568, 1999, Seite 185 ff. wird ein ähnliches Verfahren zur lateralen Erhöhung des Auflösungsvermögens eingesetzt.

Die herkömmlichen Techniken besitzen die folgenden Nachteile. Die Abbildungsverfahren sind mit einem relativ großen technischen Aufwand verbunden. So ist insbesondere bei den 4Pi-, I⁵M- und Theta-Mikroskopen die Justierung besonders schwierig. Die Verfahren sind außerdem nur schwer zu realisieren, da sie lediglich mit großem Aufwand in vorhandene Mikroskopsysteme integrierbar sind. Beim Wellenfeldmikroskop ist es ein großes Problem, dass die OTF in axialer Richtung Be-

reiche aufweist, an denen sie verschwindet. Außerdem liefert das Wellenfeldmikroskop bzw. das 4Pi-Mikroskop in lateraler Richtung, verglichen mit der herkömmlichen Epi-Fluoreszenz-Mikroskopie bzw. der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie, keinen Auflösungsgewinn.

Des Weiteren sind viele Verfahren (insbesondere die konfokale Laserscanning-4Pi- und Theta-Mikroskopie) mit einem punktweisen Abrastern des Objekts verbunden. Dies ist zeitaufwendig und vor allem bei der Bildgebung zeitabhängiger Vorgänge problematisch. Abtastende Verfahren benötigen sehr schnelle Detektoren (z. B. Photomultiplier), die jedoch gegenüber langsameren Detektoren mit Ortsauflösung (z. B. CCD's) oft eine deutlich niedrigere Detektionseffizienz besitzen. Bei der Fluoreszenz-Mikroskopie kommt noch erschwerend hinzu, dass die sinnvolle Beleuchtungsstärke durch die maximale Anregungsrate der Farbstoffe im Fokus beschränkt ist. Dies begrenzt die maximale Abtastgeschwindigkeit zusätzlich.

Es sind auch mikroskopische Abbildungsverfahren auf der Basis nicht-linearer Effekte bekannt. So wird bspw. in US-A-5 034 613, US-A-5 777 732, US-A-5 828 459 und US-A-5 796 112 die sog. Mehrphotonen-Mikroskopie beschrieben. Der konfokale Effekt wird dabei durch die gleichzeitige Absorption mehrerer Photonen an bestimmten Objektorten erzielt. Andere Techniken basieren auf der stimulierten Emission (siehe US-A-5 731 588, DE-OS 44 16 558) oder dem Entvölkern des Grundzustandes von Fluoreszenz-Molekülen, indem diese gezielt in den längerlebigen Triplettzustand gepumpt werden (siehe S.W. Hell et al. in „Applied Physics B“, Band 60, 1995, Seite 495 ff.).

Mit den Verfahren auf der Grundlage nicht-linearer optischer Effekte konnte bisher keine erhebliche Erhöhung des Auflösungsvermögens erreicht werden. Dies hängt insbesondere damit

zusammen, dass zur Erzielung von Mehrphotonen-Absorptionen die einzelnen Photonen relativ geringe Energien und somit große Wellenlängen besitzen müssen. Außerdem ist die Übertragungseffizienz bei hohen Raumfrequenzen im Allgemeinen sehr schlecht, weil typischerweise nur ein sehr kleiner Teil des Beleuchtungsmusters hohe Raumfrequenzen enthält.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Abbildungsverfahren mit einem hohen Auflösungsvermögen anzugeben. Das Verfahren soll insbesondere die o. g. Nachteile herkömmlicher Mikroskopie-Verfahren überwinden, mit einem vereinfachten technischen Aufwand realisierbar sein, eine schnelle Bildaufnahme auch zeitabhängiger Vorgänge erlauben und mit herkömmlichen optischen Systemen kompatibel sein. Das erfindungsgemäße Verfahren soll des Weiteren ermöglichen, bekannte mikroskopische Verfahren unter Beibehaltung ihrer jeweiligen Vorteile so zu erweitern, dass das Auflösungsvermögen zusätzlich gesteigert wird. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, ein optisches System zur Durchführung derart verbesserter Verfahren anzugeben.

Diese Aufgaben werden durch ein Verfahren und ein optisches System mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 14 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung ist es, zur Gewinnung einer Objektabbildung (Bild einer Objektstruktur) mindestens zwei Teilbilder eines Objekts unter jeweils verschiedenen Objektbedingungen aufzunehmen, die am Objekt mit räumlichen Mustern ausgebildet sind, wobei jeweils für einen Objektpunkt eine nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt her detektier-ten Lichtes von den am Objektpunkt gegebenen Objektbedingungen besteht und die Teilbilder unterschiedliche Beiträge ver-

schiedener Raumfrequenzanteile der Objektstruktur enthalten, und aus den Teilbildern durch Rekonstruktion der Raumfrequenzanteile die gewünschte Objektabbildung zu gewinnen. Die Einstellung von Objektbedingungen mit verschiedenen räumlichen Mustern zur Erfassung der verschiedenen Teilbilder besitzt den Vorteil, dass virtuell nieder- und höherfrequente Raumfrequenzanteile im Muster der Objektbedingungen erzeugt werden, an die die Raumfrequenzanteile der Objektstruktur gekoppelt sind. Durch diese Kopplung werden die Raumfrequenzanteile der Objektstruktur in Bezug auf das Raumfrequenzintervall verschoben, das entsprechend der lichtoptischen Transferfunktion (OTF) für eine Bilderfassung offen ist. Aus den Teilbildern kann die vollständige Objektabbildung mit einem entsprechend erweiterten Raumfrequenzbereich rekonstruiert werden.

Durch Ausnutzung eines nicht-linearen Zusammenhangs zwischen vom Objekt ausgehenden Licht und dem lokalen, objektpunktbezogenen Wert einer weiteren räumlichen veränderlichen Größe (z. B. der lokalen Einstrahlungs- oder Beleuchtungsintensität) lässt sich der vom Gesamtsystem effektiv übertragene Raumfrequenzbereich beträchtlich erweitern. Durch lokale Variation der Einflussgröße und die Aufnahme mehrerer Teilbilder lässt sich eine Objektabbildung rekonstruieren, deren Auflösung aufgrund der Nicht-Linearität fundamental höher als die durch das Abbe-Limit gegebene Auflösung ist. Zur Erzeugung nicht-linearer Effekte können verschiedene Möglichkeiten anwendungsabhängig gewählt werden. Ebenfalls ist die Gewinnung der Objektabbildung aus den Teilbildern anwendungsabhängig mit verschiedenen Arten der Datenauswertung möglich.

Ein wichtiges Merkmal der Erfindung ist die Einstellung vorbestimmter Objektbedingungen mit verschiedenen räumlichen Mustern. Am Objekt werden entsprechend dem jeweiligen Muster

punktweise Objektbedingungen eingestellt, von denen das erfasste Licht nicht-linear abhängig ist. Gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung ist die Einstellung vorbestimmter Objektbedingungen die Bildung eines räumlichen Musters mindestens einer Objektbedingung, von der die erfasste Lichtmenge jeweils nicht-linear abhängig ist. Gemäß einer abgewandelten Ausführungsform der Erfindung umfasst die Einstellung vorbestimmter Objektbedingungen die Erzeugung eines räumlichen Musters von mindestens zwei verschiedenen Objektbedingungen, wobei eine Abhängigkeit der erfassten Lichtmenge von einer multiplikativen Verknüpfung der Objektbedingungen und eine lineare oder eine nicht-lineare Abhängigkeit der erfassten Lichtmenge von jeder der Objektbedingungen besteht. Allgemein wird von einer multi-linearen Abhängigkeit des erfassten Lichtes (z. B. der erfassten Lichtintensität oder Lichtphase) gesprochen.

Die Zahl der Teilbilder ist abhängig von der Zahl der bei der Bildrekonstruktion meßbaren und anwendungsabhängig zu berücksichtigenden Raumfrequenzanteile im Muster des vom Objekt ausgesandten Lichtes. Diese Zahl ist insbesondere von der verwendeten Objektbedingung zur Einführung der Nicht-Linearität und von der Qualität des realisierten Abbildungsverfahrens abhängig. Beträgt die Anzahl der genannten Raumfrequenzanteile Z , so sind in der Regel mindestens Z Teilbilder aufzunehmen. Es kann aber fallabhängig auch ausreichend sein, weniger Teilbilder aufzunehmen, wenn genügend Informationen zur Rekonstruktion der Objektabbildung vorliegen. Die Zahl der Teilbilder wird fest eingestellt oder automatisch in Abhängigkeit von der Qualität der gewonnenen Objektabbildung und/oder manuell vom Nutzer des optischen Systems eingestellt.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt insbesondere die folgenden Schritte: (a) Anpassung der im Objekt herrschenden Bedingungen, die das von einem Objektpunkt ausgehende Licht zu beeinflussen imstande sind derart, daß eine nicht-lineare Abhängigkeit der von einem Objektpunkt detektierten Lichtintensität von dem Wert eines in mindestens einer Objektbedingung enthaltenen räumlichen Musters in mindestens einem detektierten Wert hervorgerufen wird oder eine jeweils zu einem Wert lineare Abhängigkeit der von diesem Objektpunkt detektierten Lichtintensität von den Werten mindestens zweier räumlicher Muster hervorgerufen wird, (b) Aufzeichnung mindestens eines Einzelbildes unter diesen Objektbedingungen, (c) Ändern der Objektbedingungen derart, daß unterschiedliche durch das Aufnahmeverfahren abgebildete Raumfrequenzanteile des Objekts sich in ihrer Amplitude und/oder Phasenbeziehung zueinander verändern, (d) Aufzeichnung wenigstens eines weiteren Einzelbildes unter jeweils gemäß (c) veränderten Objektbedingungen, und (e) Auswertung der gemessenen Bilder, indem die sich in den Einzelbildern unterschiedlich ausprägenden Objektbedingungen genutzt werden, um Informationen über das Objekt zurückzugewinnen, die zu Raumfrequenzen des Objekts gehören, welche durch eine einfache Abbildung mit dem Aufnahmeverfahren nicht zugänglich wären.

Ein erfindungsgemäßes optisches System zur Objektabbildung zeichnet sich insbesondere durch einen Mustergenerator, der zur Einstellung und Veränderung vorbestimmter räumlicher Muster von Objektbedingungen eingerichtet ist, von denen das von einem Objekt detektierte Licht nicht-linear abhängig ist, und einen Bildgenerator zur Rekonstruktion der Objektabbildung aus den erfassten Teilbildern aus.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Die Gewinnung von Objektabbildungen ist relativ einfach realisierbar. Die

Justierung des optischen Systems beschränkt sich auf einen minimalen Justierungsaufwand. Die Erfindung kann durch Nachrüstung bestehender Abbildungssysteme implementiert werden.

Von besonderem Vorteil ist, dass hohe Raumfrequenzen, die in Abbildungsobjektiven ggf. stark unterdrückt werden, nun durch die Verschiebung im Frequenzraum effizienter detektiert werden können. Zusätzlich zum lateralen Auflösungsgewinn ergibt sich auch ein axialer Auflösungsgewinn und die Möglichkeit, zur optischen Achse senkrecht stehende Ebenen in axialer Richtung zu diskriminieren. Damit liefert die Erfindung vorteilhafte Verwendungen wie die Konfokalmikroskopie. Auch in axialer Richtung ergibt sich bei Ausnutzung der nicht-linearen Abhängigkeit der erfassten Lichtmenge von den Objektbedingungen die Möglichkeit zu einem erheblichen Auflösungsgewinn.

Die Erfindung ist mit Vorteil in Kombination mit herkömmlichen Abbildungsverfahren, insbesondere Mikroskopieverfahren, anwendbar. Dies betrifft insbesondere die o. g. Techniken und die Absorptionsmikroskopie, die Reflektionsmikroskopie, die orts aufgelöste Abbildung von Fluoreszenzlebensdauern (sog. „Fluorescence Lifetime Imaging“), die Mehrphotonenmikroskopie, Interferenzmikroskopie, Konfokalmikroskopie usw..

Das erfindungsgemäße Abbildungsverfahren besitzt eine hohe Geschwindigkeit der Bildaufnahme. Die Bildgebung kann z. B. mit einer CCD-Kamera an allen Objektpunkten in der Bildebene gleichzeitig erfolgen und ist daher deutlich schneller möglich, als bei abtastenden Verfahren.

Die Erfindung ist unter Verwendung der verschiedenartigsten nicht-linearen Effekte realisierbar. Bspw. kann in einem Fluoreszenzmikroskop die Beleuchtung mit einer derartigen In-

tensität erfolgen, dass Fluoreszenzfarbstoffe im Objekt gesättigt werden. Dies ermöglicht auch, verschiedene Farbstoffe oder Farbstoffe in verschiedenen Umgebungen (z. B. in verschiedenen Bindungszuständen), die sonst schlecht zu unterscheiden wären, aufgrund verschiedener nicht-linearer Eigenschaften (Sättigungseigenschaften) zu diskriminieren.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im Folgenden aus der Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

Figur 1 eine Illustration der Objektbeleuchtung im reziproken Raum bei sinusförmiger Beleuchtung mit geringer Intensität,

Figur 2 eine Illustration der Objektbeleuchtung im reziproken Raum bei einem nicht-linear verzerrten Anregungsmuster,

Figur 3 eine Blockdarstellung eines erfindungsgemäßen optischen Systems,

Figur 4 Einzelheiten eines optischen Systems gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung,

Figur 5 Einzelheiten eines optischen Systems gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung,

Figuren 6 und 7 Simulationsergebnisse zur Illustration eines erfindungsgemäßen Verfahrens,

Figur 8 eine Kurvendarstellung zur Illustration des lateralen Auflösungsvermögens,

Figur 9 eine Kurvendarstellung der effektiven Gesamt-OTF eines erfindungsgemäßen optischen Systems (mit Rekonstruktion), und

Figur 10 Beispiele vom Objektabbildungen.

Die Erfindung wird im Folgenden zunächst anhand der theoretischen Grundlagen und anschließend an verschiedenen Beispielen erläutert. Die Erfindung ist nicht auf die gegebenen Ausführungsbeispiele beschränkt. Insbesondere im Rahmen der folgenden Begriffsbestimmung sind abgewandelte Ausführungsformen unter entsprechend variierten Objektbedingungen anwendungsabhängig realisierbar.

Der bei einer optischen Abbildung zu erfassende Gegenstand oder Teilabschnitte des Gegenstands werden im Folgenden allgemein als „Objekt“ bezeichnet. Objekte sind insbesondere alle Formen von biologischen oder synthetischen Proben, wie sie mit herkömmlichen Abbildungsverfahren und ortsauflösenden Analyseverfahren, insbesondere Mikroskopie und Spektroskopieverfahren, untersucht werden. Anwendungen ergeben sich z. B. in der Biologie, Medizin, Chemie, Halbleitertechnik, Einzelmolekülspektroskopie u. dgl.. Das Objekt kann fest, flüssig oder auch gasförmig sein.

Unter „Objektbedingungen“ werden allgemein alle Parameter und/oder Bedingungen am Ort des Objektes verstanden, mit denen eine oder mehrere Eigenschaften des vom Objekt ausgehenden Lichtes beeinflussbar sind. Zu diesen Eigenschaften zählen insbesondere die Intensität, der Polarisationszustand, die Phase, die Farbe, die Pulsform, die Pulslänge, der Kohärenzgrad, die Photonenkorrelation und dergleichen. Objektbedingungen können inhärente physikalische oder chemische Ei-

enschaften des Objekts, wie z. B. eine bestimmte stoffliche Zusammensetzung, eine Temperaturverteilung oder eine Druckverteilung, oder von außen aufgeprägte Parameter, wie z. B. die Beleuchtungsintensität auf der Objektoberfläche oder im Objekt, umfassen.

Die Ausbildung der Objektbedingungen mit einem räumlichen Muster bedeutet, daß die Objektbedingungen mit einer bestimmten Ortsabhängigkeit beschrieben werden können. Das Muster kann durch eine Struktur (z. B. ein Punkt- oder Strichmuster) charakterisiert sein oder auch strukturlos sein (für alle Objektpunkte gelten die gleichen Objektbedingungen). Die Aufnahme von Teilbilder unter verschiedenen Objektbedingungen bedeutet, daß zwischen den Aufnahmen das Muster an sich (z. B. mit einem DMD-Reflektor, s. u.), die Position und/oder Orientierung des Musters relativ zur Probe (z. B. mit einem verschiebbaren Beugungsgitter, s. u.) und/oder eine Intensitätseigenschaft des Musters (z. B. mit einer Variation der Intensität der Objektbeleuchtung, s. u.) verändert wird.

Eine „nicht-lineare Abhängigkeit“ des vom Objekt ausgehenden bzw. mit einem Detektor erfassten oder detektierten Lichtes ist gegeben, wenn dessen Lichtintensität von der jeweiligen Objektbedingung Ort der Lichtaussendung (oder -streuung oder dergleichen) messbar keinem einfachen linearen Modell folgt. In einer Funktionenentwicklung, z. B. Taylor-Entwicklung (siehe unten), des detektierten Lichts treten Terme höherer Ordnung auf. Gemäß den o. g. Ausführungsformen der Erfindung kann eine nicht-lineare Abhängigkeit der Lichtintensität jeweils von einer Objektbedingung oder eine lineare Abhängigkeit der Lichtintensität von mehreren Objektbedingungen gegeben sein. Im letzteren Fall treten in der Funktionenentwicklung Mischterme auf, die die unten erläuterte Erweiterung der detektierbaren Objekt-Raumfrequenzen erlauben.

Die „detektierte Lichtintensität“, die die vom Detektor gemessene Lichtintensität ist, kann anwendungsabhängig je nach Funktionalität des Detektors von der am Ort des Detektors herrschenden mittleren Lichtintensität abweichen, wenn z. B. zeitlich moduliert detektiert wird oder ein rohes Detektorsignal mit anderen Signalen korreliert wird (z. B. durch Lock-In-Technik).

Unter einem „Teilbild“ oder „Einzelbild“ werden allgemein Bilddaten verstanden, die mit einem in weitesten Sinne abbildenden lichtoptischen Verfahren aufgenommen wurden. Es kann sich dabei um einen einzelnen Datenpunkt, mehrere an ein oder verschiedenen Objektpunkten aufgenommene Datenpunkte oder Datenpunktbereiche in ein, zwei, drei oder mehr Dimensionen handeln. Die erfindungsgemäße Änderung von Objektbedingungen bei Aufnahme verschiedener Teilbilder kann sich auf eine Änderung oder Modulierung bei jedem Datenpunkt, für Abschnitte oder Gruppen von Datenpunkten oder für ganze zwei- oder dreidimensionale Bilder oder sogar Zeitserien vorgesehen sein.

Unter „detektierbaren Raumfrequenzanteilen“ werden allgemein die Anteile des Frequenzraums der Fouriertransformierten des Objekts verstanden, die mit dem jeweils angewendeten Abbildungsverfahren prinzipiell detektierbar sind.

Die Erfindung erlaubt nicht nur eine Objektabbildung mit erhöhtem Auflösungsvermögen, sondern auch die Gewinnung von „Informationen über das Objekt“. Hierunter werden insbesondere die räumliche Verteilung einer oder mehrerer Eigenschaften des Objekts oder auch andere Parameter, wie z. B. die Position eines von seiner Struktur her bekannten Teilobjekts im Raum oder die Zusammensetzung des Objekts, verstanden.

Grundlagen der Bilderfassung

Die Bildaufnahme wird im Folgenden am Beispiel der Fluoreszenzmikroskopie erläutert. In der Fluoreszenzmikroskopie werden Objekte abgebildet, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind oder selbstständig fluoreszieren. Je nach Objektstruktur und/oder Markierungstechnik sammeln sich z. B. Markierungsfarbstoffe in bestimmten Teilbereichen (z. B. im Zellkern einer biologischen Zelle). Zur Bildaufnahme wird das Objekt mit einer geeigneten Anregungswellenlänge bestrahlt und die emittierte Fluoreszenzstrahlung detektiert. Fluoreszenzfarbstoffe emittieren mit einer Intensität, die in ersten Näherung proportional zur Intensität des am Ort des Farbstoffs eingestrahlten Lichtes ist. Die Emission erfolgt im Unterschied zur Absorptionsmikroskopie, Reflektionsmikroskopie oder auch Phasenkontrastmikroskopie im allgemeinen inkohärent zueinander. Unter Annahme einer Proportionalität zwischen der an einem Objektpunkt ausgestrahlten Fluoreszenzintensität zur dort eingestrahlten Lichtintensität des Anregungslichts lässt sich ein detektiertes Bild $I_m(\vec{x})$ (rückübersetzt in Objektraumkoordinaten \vec{x}) wie folgt beschreiben. Die ortsabhängige Beleuchtungsintensität ($Bel(\vec{x})$) wird mit der am jeweiligen Objektpunkt vorhandenen Farbstoffkonzentration $Obj(\vec{x})$ (Objektstruktur) multipliziert und das Ergebnis mit der Punktbildfunktion („Point Spread Function“, PSF) des abbildenden Systems gefaltet (siehe Gleichung (1)).

$$I_m(\vec{x}) = PSF(\vec{x}) \otimes (Bel(\vec{x}) \cdot Obj(\vec{x})) \quad (1)$$

Im reziproken Raum übersetzt sich dies in die Faltung der fouriertransformierten Beleuchtungsfunktion $F(Bel(\vec{x}))$ mit der fouriertransformierten Objektfunktion $F(Obj(\vec{x}))$ und anschließende Multiplikation mit der lichtoptischen Transferfunktion

$OTF(\vec{k})$ (F bezeichnet hier und im Folgenden die Fourierformation, die Koordinaten im reziproken Raum werden mit \vec{k} bezeichnet). Analog zu Gleichung (1) ergibt sich:

$$F(I_m(\vec{x})) = OTF(\vec{k}) \cdot (F(Bel(\vec{x})) \otimes F(Obj(\vec{x})))$$

Verallgemeinert auf andere Mikroskopieverfahren bedeutet $Obj(\vec{x})$ den jeweiligen Wert oder die Dichte der Eigenschaften des Objekts, die zu erfassen ist, und $PSF(\vec{x})$ die effektive Punktbildfunktion des gesamten Systems (Bildaufnahme und -rekonstruktion). Auch bei iterativen oder nicht-linearen Rekonstruktionsverfahren gilt dies oft noch näherungsweise.

In herkömmlichen abbildenden Systemen ist der im Wert von Null verschiedene Bereich der OTF, der auch als „Träger“ bezeichnet wird, durch die numerische Apertur und die Wellenlänge des abzubildenden Lichts auf einen gewissen Raumfrequenzbereich eingeschränkt (siehe auch US-A-5 671 085). Gleichmaßen ist auch die Fouriertransformierte der Beleuchtungsfunktion $F(Bel(\vec{x}))$ in der Ausdehnung ihres Trägers durch die Lichtwellenlänge und ggf. Aperturen des Beleuchtungssystems eingeschränkt.

Erfindungsgemäß ist nun vorgesehen, den effektiven Bereich von detektierbaren Raumfrequenzen des Objekts $F(Obj(\vec{x}))$ („Objekt-Raumfrequenzen“) auf der Grundlage der folgenden Überlegungen zu erweitern. Bei Einführung einer nicht-linearen Abhängigkeit der erfassten Lichtintensität von den Objektbedingungen ist der rechte Teil von Gleichung (1) verallgemeinert gemäß den Ausdrücken (2) bzw. (3) zu schreiben:

$$PSF(\vec{x}) \otimes I_{em}(Obj(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x})) \tag{2}$$

$$\Leftrightarrow OTF(\vec{k}) \cdot F(I_{em}(Obj(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x}))) \tag{3}$$

Entsprechend dem Ausdruck (2) wird kein linearer Zusammenhang zwischen der von einem Objektpunkt ausgehenden Lichtintensität $I_{em}(\vec{x})$ und der dort eingestrahlten Lichtintensität (enthalten in $\vec{b}(\vec{x})$) vorausgesetzt. Vielmehr ist nun $I_{em}(\vec{x})$ eine allgemeine Funktion des Wertes der zu erfassenden Objektstruktur und anderer Faktoren $\vec{b}(\vec{x})$, die die nicht-linearen Bedingungen repräsentieren. Der Vektorpfeil über \vec{b} soll andeuten, dass es sich um mehrere Bedingungen oder Eigenschaften b_i handeln kann. Ein wichtiger Faktor b_i ist die am Ort \vec{x} eingestrahlte Lichtintensität $Bel(\vec{x})$. Andere Faktoren werden unten beispielhaft genannt. Gemäß Gleichung (4) wird $I_{em}(\vec{x})$ als Taylor-Reihe mit konstanten Koeffizienten c_i angenähert ausgedrückt:

$$\begin{aligned} I_{em}(\vec{x}) \cong & c_0 + c_1 \cdot Obj(\vec{x}) + c_2 \cdot b_1(\vec{x}) + c_3 \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x}) \\ & + c_4 \cdot Obj(\vec{x})^2 \cdot b_1(\vec{x}) + c_5 \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x})^2 + \dots \\ & + c_6 \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x})^3 + \dots \end{aligned} \quad (4)$$

Zur vereinfachten Darstellung wird in Gleichung (4) nur auf eine nicht-lineare Bedingung $b_1(\vec{x})$ Bezug genommen. Anwendungsabhängig können weitere Bedingungen in den Prozess der Aussendung von Licht vom jeweiligen Objektpunkt involviert sein. In diesem Fall treten entsprechende Terme auch in der Entwicklung gemäß Gleichung (4) auf, so insbesondere auch Mischterme wie z. B. $c_{5b} \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x}) \cdot b_2(\vec{x})$. Der Term nach c_3 ist gerade der in Gleichung (1) genannte Ausdruck, wenn als nicht-lineare Objektbedingung $b_1(\vec{x}) = Bel(\vec{x})$ angenommen wird. Die Fouriertransformierte der ausgesandten Lichtintensität $F(I_{em}(Obj(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x})))$ enthält demnach analog zu Gleichung (1) den Term $c_3 \cdot F(Bel(\vec{x})) \otimes F(Obj(\vec{x}))$.

Die Fouriertransformierte der Beleuchtungsintensität $F(\text{Bel}(\vec{x}))$ ist als Summe einer Vielzahl von einzelnen δ -Funktionen darstellbar. Je nach dem aktuellen Beleuchtungsmuster werden also Teile der fouriertransformierten Objektfunktion $F(\text{Obj}(\vec{x}))$ durch die Faltung mit der fouriertransformierten Beleuchtungsfunktion verschoben und mit entsprechendem Gewicht aufaddiert. Dies ist in Figur 1 illustriert.

Figur 1 zeigt die Struktur der Anregungsverteilung im reziproken Raum bei sinusförmig verteilter, geringer Beleuchtungsintensität entsprechend einer herkömmlichen, räumlich gemusterten Beleuchtung. Die nach oben gerichteten Pfeile bezeichnen die Maxima, die aus der sinusförmigen Anregung herühren (Fouriertransformierte der Sinusfunktion). Zusätzlich ist die an das Maximum k_b „gekoppelte“ Struktur der Fouriertransformierten der Objektfunktion $F(\text{Obj}_{+1}(k))$ eingezeichnet. Die an die anderen Maxima gekoppelten Fouriertransformierten der Objektfunktion sind aus Übersichtlichkeitsgründen nicht eingezeichnet. Tatsächlich ist jedoch, da $\text{Obj}(\vec{k})$ mit den virtuellen Raumfrequenzteilen im Muster der Objektbedingungen im reziproken Raum zu falten ist, $\text{Obj}(\vec{k})$ an jedes virtuelle Maximum „gekoppelt“. Nur der mittlere Teil an emittierten Raumfrequenzen (als Träger der OTF eingezeichnet) ist der Detektion zugänglich.

In Figur 1 ist beispielhaft illustriert, wie aus der Summe entsprechend der genannten Faltung durch die optische Abbildung (Multiplikation mit der raumfrequenzbegrenzten OTF) der detektierbare Bereich festgelegt („ausgestanzt“) wird. Der Bereich detektierbarer Objekt-Raumfrequenzen wird bei Beleuchtung mit einem bestimmten Muster deutlich gegenüber dem Fall einer gleichmäßigen Beleuchtung erweitert. Mit den unten

erläuterten Rekonstruktionsverfahren lassen sich die verschobenen Objekt-Raumfrequenzen wieder zu einem konsistenten Bild zusammensetzen.

Entsprechend Gleichung (4) liefern im nicht-linearen Fall aber auch Terme höherer Ordnung in $b_1(\vec{x})$ Beiträge zu I_{em} wie z. B. die Terme mit den Faktoren c_5 bzw. c_6 . Die Fouriertransformierten dieser Terme sind auch in $F(I_{em}(\text{Obj}(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x})))$ enthalten. Mit $b_1(\vec{x}) = \text{Bel}(\vec{x})$ erhält man im Ausdruck (2) auch den Term $c_5 \cdot [F(\text{Bel}(\vec{x})) \otimes F(\text{Bel}(\vec{x}))] \otimes F(\text{Obj}(\vec{x}))$. Mit einem gewissen Anteil im Bild ist es jetzt möglich, Raumfrequenzen des Objekts zu messen, die vorher noch nicht zugänglich waren, da sie durch die Faltung mit der raumfrequenzbegrenzten Funktion $F(\text{Bel}(\vec{x}))$ noch nicht in den mittels OTF detektierbaren Bereich geschoben werden konnten. Die Ausdehnung des Trägers von $F(\text{Bel}(\vec{x})) \otimes F(\text{Bel}(\vec{x}))$ kann nun aber entsprechend größer sein, wodurch sich auch höhere Raumfrequenzen in den der OTF entsprechenden Bereich verschieben und so in der Abbildung messbar sind. Weitere höhere Ordnungen wirken sich entsprechend in weiteren Faltungen mit den Fouriertransformierten der $b_i(\vec{x})$ aus, so dass noch höhere Objekt-Raumfrequenzen detektierbar sind. Im Prinzip ist es möglich, beliebig hohe Raumfrequenzen des Objekts zu detektieren und damit die Auflösung beliebig zu erhöhen, soweit entsprechende Koeffizienten in der Reihenentwicklung gemäß Gleichung (4) vorhanden sind. In der Praxis wird die bei der Rekonstruktion erzielbare Auflösung jedoch oft durch das bei den hohen Objekt-Raumfrequenzen erreichbare Signal-Rausch-Verhältnis begrenzt.

Das effektive Auftreten nieder- und höherfrequenter Komponenten des Beleuchtungsmusters im reziproken Raum ist in Figur 2 am Beispiel der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Wird das Objekt mit einer genügend hohen Beleuchtungsintensität be-

strahlt, so ergibt sich eine nicht-lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzemission von der Anregungsintensität (Sättigung der Fluoreszenz) und damit ein Muster der Anregbarkeit von Fluoreszenz (im Folgenden: Anregungsmuster) eines bestimmten Farbstoffes, das grundsätzlich aus unendlich vielen (virtuellen) Maxima im reziproken Raum besteht, deren absolute Höhe allerdings mit steigendem $|\vec{k}|$ schnell abnimmt. Wie oben am Beispiel der relativ schwachen Anregungsintensität (linearer Fall, Figur 1) erläutert, ist die Objektfunktion an jede der Komponenten der Beleuchtungsfunktion gekoppelt. In einem als Teilbild I_{em} aufgenommenem Detektorsignal sind also alle Informationen, insbesondere über die interessierenden hochfrequenten Ortsfrequenzen der Objektfunktion enthalten. Die Rückgewinnung dieser Informationen wird unten in Zusammenhang mit der Bildrekonstruktion beschrieben.

Figur 2 illustriert die Struktur der Anregungsverteilung im reziproken Raum bei einem nicht-linear verzerrten Anregungsmuster. Zu dem virtuellen Maximum $n = +2$ entsprechend $2k_b$ ist eine gekoppelte Struktur der Fouriertransformierten der Objektfunktion eingezeichnet ($Obj_{+2}(\vec{k})$). Praktisch ist $Obj(\vec{k})$ wiederum an jedes Maximum gekoppelt (aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt) und mit verschobenen, unterschiedlich intensiven und phasengedrehten Versionen von sich selbst überlagert. Nur der mittlere Teil an emittierten Raumfrequenzen (Träger der OTF) ist der Detektion zugänglich.

Das Ziel der optischen Abbildung ist die Gewinnung einer Objektabbildung, d. h. der das Objekt beschreibenden Funktion $Obj(\vec{x})$. Diese Funktion muss aus den gemessenen Teilbildern I_m rekonstruiert werden. Die Rekonstruktion der Objektabbildung basiert darauf, dass die Faktoren $b_i(\vec{x})$ aus den Teilbildern I_m extrahiert werden oder unabhängig von der Bildaufnahme be-

kannt sind. Die erfindungsgemäße Unterscheidung der Faktoren $b_i(\vec{x})$ von der das Objekt beschreibenden Funktion $\text{Obj}(\vec{x})$ erfolgt, indem die Faktoren b_i , d. h. die oft räumlich gemusterten Objektbedingungen, variiert werden.

Die Variation der Objektbedingungen kann auf verschiedene Arten erfolgen. Eine erste Möglichkeit besteht darin, $b_i(\vec{x})$ als ein räumliches Muster auszubilden, das am Objekt zur Aufnahme verschiedener Teil- oder Einzelbilder jeweils verschoben wird. Alternativ ist es aber auch möglich, die Stärke des Musters (Kontrast der eingestellten Objektbedingungen am gesamten Objekt) oder die Form des Musters jeweils für die Aufnahme von Teilbildern zu verändern. In jeden Falle werden die in der Entwicklung gemäß Gleichung (4) gezeigten Komponenten unterscheidbar.

Die Bilderfassung des erfindungsgemäßen Erfahrens basiert auf der Aufnahme von mindestens zwei Teilbildern mit verschiedenen Objektbedingungen, unter denen die Faktoren $b_i(\vec{x})$, mit denen die erfasste Lichtintensität in nicht-linearem Zusammenhang steht, variiert werden. Die Rekonstruktion der Objektabbildung aus den Teilbildern wird im Folgenden erläutert.

Rekonstruktion der Objektabbildung

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die in der Taylor-Entwicklung gemäß Gleichung (4) enthaltenen Terme, soweit sie einen messbaren Einfluss besitzen, durch das Lösen eines Gleichungssystems ermittelt und so voneinander getrennt. Das Gleichungssystem, dessen Ermittlung unten im Einzelnen erläutert ist, lässt sich trotz der Multiplikation mit der OTF an jedem Punkt im Bereich des Trägers der OTF im reziproken Raum bestimmen und im Prinzip lösen. Durch

Verschiebung in Fourierraum (oder durch Multiplikation mit $\exp(i\overline{\Delta k}\overline{x})$ im Ortsraum, $\overline{\Delta k}$: Frequenzraum-Verschiebevektor) können die individuellen Komponenten dann so zusammengesetzt werden, dass sich ein hochauflösendes Bild ergibt. Dieses kann ggf. mit weiteren Dekonvolutionstechniken verarbeitet werden, um die Bildqualität weiter zu steigern.

Wie schon aus US-A-5 671 085 bekannt ist, ergibt die Beleuchtung des Objekts mit einem Muster aus möglichst hohen Raumfrequenzen eine Auflösungserhöhung gegenüber der herkömmlichen Lichtmikroskopie. Durch die erfindungsgemäße Ausnutzung eines nicht-linearen Zusammenhangs zwischen der Stärke eines Musters, z. B. Werten bestimmter Objektbedingungen, an einem Objektpunkt und der von diesem Objektpunkt ausgehenden (emittierten bzw. gestreuten) Lichtintensität ist es möglich, ein Bild mit einer noch höheren Ortsauflösung zu berechnen.

Ein Beispiel für die Bildung eines Musters von Objektbedingungen ist bei der Anregung von Fluoreszenz mit einer ortsabhängigen Verteilung intensiven Anregungslichts gegeben. Die nicht-lineare Abhängigkeit des vom Detektor erfassten Lichts kann z. B. durch die Sättigung der Anregung von im Objekt vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffen entstehen. Besitzt das Anregungslicht eine genügend hohe Intensität, so erhält man eine nicht-linearen Zusammenhang zwischen der eingestrahlten und der emittierten Lichtintensität am betrachteten Objekt (siehe z. B. D.R. Sandison et al. in „Handbook of Biological Confocal Microscopy“, Plenum Press, New York and London, 2. Auflage, 1995, Kapitel 3, Seiten 47 bis 50; und R.Y. Tsien et al. im genannten „Handbook of Biological Confocal Microscopy“, Kapitel 16). Das detektierte Licht enthält nun auch Informationen über Raumfrequenzen des Objekts, die sonst nicht zugänglich wären. Allerdings enthält jedes so aufgenommene Bild eine Mischung von Anteilen hoher Raumfrequenzen, die

aber dann durch Aufnahme unter unterschiedlichen Bedingungen und Verrechnung mehrerer Teilbilder getrennt und zu einem konsistenten, hochauflösenden Bild zusammengesetzt werden können.

Das Gleichungssystem zur Trennung der Komponenten der Taylor-Entwicklung gemäß Gleichung (4) wird bspw. im Fall der Fluoreszenzmikroskopie bei Beleuchtung mit einer einem Liniengitter ähnlichen Struktur mit den folgenden Schritten ermittelt.

Die Intensitätsverteilung des Anregungslichts wird bei diesem Beispiel annähernd durch eine in den positiven Bereich verschobene Sinusfunktion beschrieben. Als Fouriertransformierte ergeben sich im Idealfall punktförmige Maxima bei

$\bar{k} = 0$, $\bar{k} = +\bar{k}_b$ und $\bar{k} = -\bar{k}_b$ (siehe Figur 1). Diese Maxima besitzen je nach Modulationsgrad eine bestimmte Energie und einen bestimmten Phasenwinkel in der komplexen Ebene, der von der Position bzw. der Verschiebung (Lage) des Musters des Anregungslichts abhängt. Durch den Einfluss der nicht-linearen Abhängigkeit der Fluoreszenzemission von der Anregungsintensität (Sättigung der Fluoreszenz) ergibt sich das in Figur 2 gezeigte Muster mit nieder- und höherfrequenten Komponenten im reziproken Raum, bspw. als Anregbarkeitsmuster für einen bestimmten Fluorophortyp.

Zur Rekonstruktion der Objektbildung genügt es, dass näherungsweise bei einem endlichen Raumfrequenzwert $\bar{k}_{\max} = \pm m\bar{k}_b$ abgebrochen wird und in der Rechnung nur Maxima mit kleineren Raumfrequenzen berücksichtigt werden.

Wird das Anregungslichtmuster gegenüber dem Objekt verschoben, so ändern sich die jeweiligen komplexen Phasenlagen der einzelnen punktförmigen Maxima im Fourieraum. Berücksichtigt

man $\pm m$ Anregungs-Maxima und das Maximum bei $\bar{k} = 0$, so benötigt man $Z = 2m + 1$ unter verschiedenen Bedingungen aufgenommene Bilder, um die einzelnen durch das Mikroskop abgebildeten Komponenten des Objekts, die mit dem jeweiligen Maximum gefaltet (also verschoben) sind, separieren zu können (in Figur 2 ist nur eine Komponente dargestellt). Es kann z. B. vorgesehen sein, dass $Z = 5$ Maxima berücksichtigt werden. Der Phasenwinkel der Maxima im Frequenzraum des Anregungsmusters bewegt sich bei Verschiebung des Musters proportional zu $n|\bar{k}_b|$, da eine Verschiebung im Raum um $\bar{\Delta x}$ einer Multiplikation im Frequenzraum mit $\exp(i\bar{k}\bar{\Delta x})$ entspricht. Dabei entspricht n der Nummer des jeweiligen Raumfrequenzanteils (siehe Figur 2). Werden also verschiedene Bilder (Teilbilder) $I_n(\bar{k}) = F(I_n(\bar{x}))$ des Objekts mit jeweils um ein Fünftel des Grundmusters gegeneinander verschobener Phasenlage des Beleuchtungsmusters (also auch des Anregungsmusters) aufgenommen, so ergibt sich das folgende Gleichungssystem:

$$M \cdot \begin{pmatrix} \text{Obj}_0(\bar{k}) \\ \text{Obj}_{+1}(\bar{k}) \\ \text{Obj}_{-1}(\bar{k}) \\ \text{Obj}_{+2}(\bar{k}) \\ \text{Obj}_{-2}(\bar{k}) \end{pmatrix} = \text{const} \cdot \begin{pmatrix} I_0(\bar{k}) \\ I_1(\bar{k}) \\ I_2(\bar{k}) \\ I_3(\bar{k}) \\ I_4(\bar{k}) \end{pmatrix}$$

$$M = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp(i2\pi/5) & \exp(-i2\pi/5) & \exp(i4\pi/5) & \exp(-i4\pi/5) \\ 1 & \exp(i4\pi/5) & \exp(-i4\pi/5) & \exp(i8\pi/5) & \exp(-i8\pi/5) \\ 1 & \exp(i6\pi/5) & \exp(-i6\pi/5) & \exp(i12\pi/5) & \exp(-i12\pi/5) \\ 1 & \exp(i8\pi/5) & \exp(-i8\pi/5) & \exp(i16\pi/5) & \exp(-i16\pi/5) \end{bmatrix}$$

In diesem Gleichungssystem bezeichnen die $\text{Obj}_n(\bar{k})$ die zum n . Maximum des Anregungsmusters gehörenden, verschobenen kom-

plexwertigen Komponenten des fouriertransformierten Objekts (Objekt-Raumfrequenz), die dann durch die OTF des abbildenden Systems transmittiert werden.

Die Lösung des Gleichungssystems liefert die individuellen Objektkomponenten, die zum jeweiligen Maximum des Anregungsmusters gehören. Die Lösung kann z. B. durch Invertieren der Matrix M erfolgen. Durch Multiplikation der inversen Matrix (M^{-1}) mit dem rechts stehenden Vektor der gemessenen Intensitäten $I_n(\vec{k})$ werden die individuellen transmittierenden Objektkomponenten ermittelt. Liegen mehr Messdaten vor als zur Lösung der Rekonstruktionsaufgabe nötig sind, so kann z. B. eine analoge, nicht quadratische oder rechteckige Matrix aufgestellt werden. Für die Berechnung der Lösung ist dann z. B. das Verfahren der pseudoinversen Matrix anwendbar, das es erlaubt, eine Lösung im Sinne der kleinsten Fehlerquote zu ermitteln.

Die Rechnung wird aufgrund der Linearität der Fouriertransformation vorzugsweise bildpunkt- oder pixelweise im Realraum ausgeführt.

Die komplexwertigen Komponenten $\text{Obj}_n(\vec{k})$ können nun um den Vektor $\vec{\Delta k}$ im Fourieraum (oder durch die o. g. entsprechende Multiplikation im Realraum) verschoben werden, so dass die jeweilige Raumfrequenz \vec{k} dort zu liegen kommt, wo sie bei musterfreier, gleichmäßiger Beleuchtung gemessen werden würde. $\vec{\Delta k}$ ist hier also $-\vec{n k_b}$.

In einem weiteren Schritt ist eine Korrektur der Komponenten $\text{Obj}_n(\vec{k})$ in ihrer komplexen Phasenlage je nach gegenseitiger Phasenlage ϕ_n der Frequenzraum-Anregungsmaxima im Bild I_0

vorgesehen (Multiplikation mit $\exp(-i\phi_n)$). Anschließend werden die Komponenten $\text{Obj}_n(\vec{k})$, ggf. durch eine gewichtete Addition, zu einem konsistenten Bild (der gewünschten Objektabbildung) vereinigt. Damit wird eine Ausdehnung des Trägers der Gesamt-OTF auf einen relativ zur linearen Abbildung deutlich vergrößerten Bereich und damit eine Erhöhung des Auflösungsvermögens ermöglicht.

Die illustrierte Verschiebung von Raumfrequenzkomponenten kann in verschiedenen Raumrichtungen durchgeführt werden. Dies kann nacheinander durch unterschiedliche Orientierung des Beleuchtungsmusters oder simultan durch Beleuchtung mit einer mehrdimensionalen Struktur erfolgen. Das Auflösungsvermögen ist in ein, zwei oder drei Dimensionen vergrößerbar. Die Gesamttransferfunktion kann im Anschluss daran oder bei Zwischenschritten noch durch entsprechendes Filtern und/oder Anwenden von an sich bekannten Entfaltungstechniken verändert werden.

Die Rekonstruktion der Objektabbildung ist nicht auf die beschriebene Lösung des Gleichungssystems mit der Matrix-Methode beschränkt. Alternativ können z. B. Quadratur-Techniken (analog zu WO 98/45745) oder algebraische bzw. iterative Rekonstruktionsverfahren (Maximum Likelihood/Expectation Maximization, Maximum Entropie, Algebraic Reconstruction und dergleichen) verwendet werden.

Die Erfindung ist nicht auf die nicht-lineare Anregung von Fluoreszenzemission beschränkt. Die Verfahrensweise ist entsprechend auch mit beliebig anderen Faktoren b_i implementierbar, die geeignet sind, allein für sich oder im Zusammenwirken untereinander, insbesondere im Zusammenwirken mit der Beleuchtungsintensität, die Intensität des vom Objekt ausgehenden Lichts zu beeinflussen.

Ausführungsbeispiele erfindungsgemäßer optischer Systeme

Ein erfindungsgemäßes optisches System ist in Figur 3 dargestellt. Die an sich bekannten Komponenten eines herkömmlichen Mikroskops sind mit gestrichelten Rahmen eingezeichnet. Das optische System 100 ist mit einer Beleuchtungseinrichtung 10, mindestens einem Mustergenerator 20, 20', 20'', einer Beleuchtungsoptik 30, einer Abbildungsoptik 50, einer Detektoreinrichtung 60 und einem Bildgenerator 70 aufgebaut. Das Bezugszeichen 40 bezieht sich auf die mit dem System 100 zu untersuchende Probe. Die Komponenten 10, 30, 50 und 60 können durch optische Bauteile bereitgestellt werden, wie sie aus der Lichtmikroskopie und aus der optischen Mess- und Analysetechnik, z. B. der Spektroskopie, bekannt sind. Anwendungsabhängig können die Komponenten 30 und/oder 50 entfallen oder durch ein gemeinsames Bauteil gebildet werden. Es kann auch vorgesehen sein, dass die Komponenten 20 und 30 durch ein gemeinsames optisches Bauteil gebildet werden.

Der Mustergenerator 20, 20' und/oder 20'' ist allgemein eine Einrichtung zur Bildung von Objektbedingungen mit einem vorbestimmten räumlichen Muster am Objekt 40. Anwendungsabhängig kann der Mustergenerator 20 eine Maske mit einer bestimmten ein- oder zweidimensionalen Übertragungscharakteristik entsprechend dem gewünschten Muster sein. Die Maske kann insbesondere durch ein Beugungsgitter (siehe Figur 4) (oder Phasengitter) oder eine Matrixanordnung aus einzeln ansteuerbaren Reflektor- oder Transmissionspixeln gebildet werden. Im letzteren Fall werden DMD-Einrichtungen („Digital Mirror Device“) bzw. LCD-Matrixanordnungen verwendet. Der Mustergenerator kann auch eine Spiegelanordnung zur Erzeugung eines Interferenzmusters (siehe Figur 5) oder eine Einrichtung zur unmittelbaren physikalischen oder chemischen Beeinflussung

des Objekts 40 (z. B. eine Heizeinrichtung oder einen Ultraschallgeber) umfassen. Abweichend von der Komponente 20 in Figur 3 kann der Mustergenerator auch zwischen der Beleuchtungsoptik 30 und dem Objekt 40 (Komponente 20'') oder unmittelbar am Objekt 40 vorgesehen sein (Komponente 20').

Der Bildgenerator enthält eine Einrichtung zur Rekonstruktion der Objektabbildung entsprechend den oben erläuterten Prinzipien. Als Bildgenerator kann ein speziell ausgelegter Schaltkreis oder auch ein entsprechend programmierter Computer verwendet werden. Der Bildgenerator kann zusätzlich Speicher-, Steuer- und/oder Anzeigekomponenten enthalten.

Figur 4 zeigt Einzelheiten eines erfindungsgemäßen optischen Systems am Beispiel eines Epifluoreszenzmikroskops 100. Die Beleuchtungseinrichtung 10 wird durch eine intensive Lichtquelle gebildet. Da zur Ausnutzung nicht-linearer Effekte hohe Lichtintensitäten benötigt werden, wird vorzugsweise eine gepulste Lichtquelle, wie z. B. ein Pulslaser oder eine Blitzlampe verwendet. Die Beleuchtungseinrichtung kann aber auch durch eine Hochdruckdampflampe (z. B. Quecksilberdampflampe) gebildet werden. Als Mustergenerator 20 (Maske) ist beispielhaft ein verstellbares und ggf. drehbares und/oder verschiebbares Beugungsgitter 22 vorgesehen, das entsprechend der Position 21 der Bildfeldblende in einer konjugierten Objektebene angeordnet ist. Das Beugungsgitter 22 ist ein Transmissionsgitter mit einem Gitterabstand von z. B. 30 µm. Das Beugungsgitter 22 ist an einem (nicht dargestellten) Stellantrieb angeordnet.

Die Beleuchtungsoptik 30 weist einen Anregungsfilter 31, einen dichroitischen Spiegel 32 zum Einkoppeln des Anregungslichts in eine Mikroskopsäule und Objektivlinsen 33. Am Ort des Objekts 40 wird ein Bild des Beugungsgitters 22 als Be-

leuchtung für die zu untersuchende Probe in der entsprechenden Fokusebene gebildet. Die Abbildungsoptik 50 wird wiederum durch die Objektvlinsen 33, einen Emissionsfilter 51 und einer optional vorgesehenen Optik 52 zur Bildvergrößerung gebildet. Die Detektoreinrichtung 60 ist ein CCD-Detektor, von dem auf den (nicht dargestellten) Bildgenerator Daten übertragen werden.

Beim Aufbau gemäß Figur 4 kann das Beugungsgitter 22 durch eine DMD-Einrichtung oder eine LCD-Matrixanordnung ersetzt werden, die im Lichtweg zwischen der Beleuchtungseinrichtung 10 und dem Objekt 40 angeordnet ist. In diesem Fall ist zwischen den Komponenten 20 und 40 eine zusätzliche Verkleinerungsoptik vorgesehen. Eine DMD-Einrichtung umfaßt z. B. rd. $450 \cdot 600$ Reflektorelemente mit einer Pixelgröße von rd. $17 \cdot 17 \mu\text{m}^2$.

Für die erfindungsgemäße Aufnahme mehrerer Teilbilder mit unterschiedlichen Phasenlagen wird das Beugungsgitter 22 in kleinen Schritten gegenüber dem Objekt 40 verschoben. Die Schrittweite ist von der Strukturdimension der Maske und der Zahl der aufzunehmenden Teilbilder abhängig und beträgt z. B. bei $30 \mu\text{m}$ Strukturdimension und 7 Teilbildern $30/7 \mu\text{m}$). Alternativ kann auch bei einem feststehenden Beugungsgitter 22 eine Verschiebung des Objekts 40 vorgesehen sein, wobei dies jedoch zusätzliche Schritte der Bildkorrektur bei der Rekonstruktion der Objektabbildung erfordert. Alternativ ist es auch möglich, die Phase der verschiedenen Beugungsmaxima direkt durch geeignete optische Elemente zu beeinflussen. Die minimale Anzahl der für die Rekonstruktion des Gesamtbildes notwendigen Aufnahmen von Teilbildern ergibt sich durch die Anzahl der Unbekannten des zugehörigen Gleichungssystems (siehe oben). Es sind mindestens zwei Teilbildaufnahmen vorgesehen.

Um die Auflösung in allen Raumrichtungen zu erhöhen, wird das Objekt 40 mit Mustern unter verschiedenen Winkeln nacheinander oder mit einer Maske wie bspw. mit der DMD- oder LCD-Einrichtung mit einem zweidimensionalen Muster, das Beugungsmaxima in mehreren Richtungen der Ebene hervorruft, in verschiedenen Phasenlagen in jeder Dimension beleuchtet.

Durch Erstellen von Fokusserien kann man noch zusätzliche Informationen über die axiale Struktur des Objekts gewinnen und damit dreidimensionale Objektabbildungen ableiten. Dies wird einerseits durch die inkohärente Lichtquelle und andererseits durch das Vorhandensein der Nullpunkt-Beugungsordnung des Gitters noch zusätzlich erleichtert. Ein weiterer Auflösungsgewinn kann durch Drehen des Objekts um eine auf der optischen Achse senkrecht stehende Achse unter dem optischen System erreicht werden.

Das Objekt 40 wird mit derart Momentanintensitäten beleuchtet bzw. angeregt, dass die Farbstoffe in der Probe gesättigt werden, so dass sich die gewünschten nicht-linearen Effekte zur Erhöhung des Auflösungsvermögens ergeben. Die gesuchten Anteile der sich überlagernden individuellen Ordnungen können aus den Bildern bei verschiedenen Phasenlagen der Anregungsstruktur errechnet werden. Es ist auch möglich, aus Aufnahmen von Teilbildern mit verschiedener Beleuchtungsintensität hoch auflösende Bilder zu rekonstruieren. Unterdrückt man (z. B. durch Ausblenden) die Nullpunkt-Beugungsordnung des Beugungsgitters 21, so erhöht man damit in vorteilhafter Weise den Modulationsgrad der Beleuchtungsfunktion und damit die relative Intensität in höheren Anregungsordnungen. Außerdem kann die Energie in höhere Raumfrequenzbereiche geschoben werden.

Bei dem abgewandelten Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops 100 gemäß Figur 5 wird die Probe (das Objekt) 40 mit Laserlicht beleuchtet. Die Lichtquelle 10 ist vorzugsweise ein Pulslaser (z. B. mit einem optisch-parametrischen Oszillator, der mit einem frequenzverdreifachten NdYAG-Laser gepumpt ist, oder mit einem Ti-Saphir-Laser), kann aber auch durch eine andere genügend intensive Lichtquelle gebildet werden. Der Mustergenerator 20 wird durch eine Gruppe ebener Spiegel 23 - 27 gebildet, die dazu eingerichtet sind, das Anregungslicht von der Lichtquelle 10 auf verschiedene Strahlengänge zu zerlegen, die aus verschiedenen Richtungen auf das Objekt 40 treffen. Das Anregungslicht wird mit dem teildurchlässigen Spiegel 23 und die voll reflektierenden Spiegel 25 - 27 von zwei entgegengesetzten Seiten auf das Objekt 40 gerichtet. Optional kann der zweite teildurchlässige Spiegel 24 vorgesehen sein, um einen dritten Anregungslichtweg zum Objekt 40 zu bilden. Es ergeben sich drei miteinander interferierende Anregungs-Lichtstrahlen, die eine Verwendung des Mikroskops 100 in der höchstaflösenden 3D-Mikroskopie erlauben. Für zweidimensionale Anwendungen kann auf den Spiegel 24 verzichtet werden. Die Strahlen interferieren über einen Bereich der in der Größenordnung der Kohärenzlänge der Lichtquelle 10 liegt.

Zur Veränderung der Objektbedingungen (Interferenzmuster am Objekt 40) zur Aufnahme verschiedener Teilbilder sind mindestens zwei Spiegel verschiebbar angeordnet. Bspw. ist vorgesehen, dass die Spiegel 24 und 25 zur Änderung des Interferenzmusters verschiebbar sind. Alternativ ist zur Veränderung der Objektbedingungen mindestens ein elektrooptisches Element zur Änderung der Phasenlage des Beleuchtungslichts in einem der Teil-Lichtwege vorgesehen.

Die Beleuchtungsoptik 30 ist in Figur 5 aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt, kann aber ggf. bauformabhän-

gig ohnehin weggelassen werden. Die Abbildungsoptik 50 umfasst die Objektivlinsen 53, den Emissionsfilter zur Absorption des Anregungslichts 51 und optional eine Optik 52 zur Bildvergrößerung. Als Detektor ist wiederum ein CCD-Detektor 60 vorgesehen.

Um ein gute axiale Diskriminierung zu erhalten, kann das Anregungslicht zugleich noch aus einer oder mehreren Richtungen durch das (nicht dargestellte) Objektiv und/oder von der dem Objektiv abgewandten Seite auf das Objekt 40 fallen, das sich im Differenzbereich der Anregungslichtstrahlen (kreuz schraffierte Region) befindet. Die durch Nicht-Linearitäten erzielbare zusätzlich Auflösungserhöhung kann wiederum durch Benutzung entsprechend starker Laser bzw. gepulster Laser mit hohen Momentanintensitäten erreicht werden. Auch die Verwendung anderer intensiver Lichtquellen (z. B. Blitzlicht) ist möglich und ggf. vorteilhaft.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden mehrere Teilbilder jeweils mit verschiedenen Interferenzmustern am Objekt 40 aufgenommen und nach den oben erläuterten Prinzipien zur Gewinnung der Objektabbildung verarbeitet.

Die erläuterten Ausführungsbeispiele basieren auf der Ausnutzung der nicht-linearen Abhängigkeit des erfassten Lichtes von der Intensität des Anregungslichts durch Sättigung von Fluoreszenzfarbstoffen. Alternative nicht-lineare Effekte sind durch die Sättigung der Absorption von Anregungslicht unter intensiver Beleuchtung, die Abhängigkeit der Phase des emittierten oder gestreuten Lichts von der im Objekt vorhandenen Beleuchtungsintensität, die sich im Detektor (z. B. über Interferenz) oder vor diesem in einer nicht-linearen Intensitätsabhängigkeit umsetzt, SHG- oder THG-Prozesse, eine Abhängigkeit der Lichteigenschaften der Ramanstreuung vom

Wert einer oder mehrerer Objektbedingungen, zeitlich kohärente Effekte (z. B. Rabi-Oszillationen) an Atomen oder Molekülen im Objekt, CARS-Prozesse, Mehrphotonen-Absorptionen, stimulierte Emissionen im Objekt, die Besetzung langlebiger Anregungszustände oder chemisch veränderter Zustände in den Fluorophoren vor oder während der Beleuchtung, strahlungslose Energietransferprozesse und/oder physikalische oder chemische Objektbedingungen gegeben.

Insbesondere zur Ausnutzung zeitlich kohärenter Effekte (Rabi-Oszillationen) an Atomen oder Molekülen oder Fluorophoren im Objekt (in Lösung, in Festkörpern, in Gasen oder auch unter Vakuumbedingungen) werden vorzugsweise Beleuchtungseinrichtungen mit extrem kurzen Pulslängen (z. B. <100 fs) verwendet. Basiert der nicht-lineare Effekt auf der stimulierten Emission so wird diese gleichzeitig oder in zeitlicher Abfolge induziert. Die stimulierte Emission kann bei der selben Wellenlänge wie der des Anregungslichts oder auch bei anderen Wellenlängen, z. B. bei einer typischen Fluoreszenzwellenlänge, induziert werden. Die Ausnutzung von Energietransferprozessen bedeutet, dass Energie der Anregungsstrahlung stahlend oder strahlungslos von Fluorophoren auf benachbarte Fluorophor-Moleküle übertragen wird und dadurch eine multi-lineare Abhängigkeit der emittierten Lichtintensität von der am Nachbarort eingestrahnten Intensität entsteht.

Zu den physikalischen oder chemischen Änderungen der Objektbedingungen zählt insbesondere die Ausnutzung der nicht-linearen Abhängigkeit des von den Objektpunkten ausgehenden Lichts von einem räumlich inhomogenen elektrischen oder magnetischen Feld oder vom am Objektpunkt herrschenden Druck, Scherkräften oder mechanischen Spannungsverhältnissen. Es kann auch ein am Objekt gebildeter Temperaturgradient entsprechend einem bestimmten Muster vorgesehen sein, der die

gewünschte multi-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt ausgehenden Lichts von der jeweils herrschenden Temperatur herstellt. Es kann auch eine multi-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt ausgehenden Lichts von den dort herrschenden chemischen Bedingungen (z. B. pH-Wert) verwendet werden. Zusätzlich kann eine Objektbestrahlung mit Radiowellen, Mikrowellen, Infrarotlicht, Röntgenstrahlung oder auch Schallwellen oder Ultraschallwellen ausgenutzt werden.

Zur Realisierung der genannten Effekte ist der Mustergenerator entsprechend angepasst. Bspw. kann der Mustergenerator eine zusätzliche Bestrahlungseinrichtung umfassen, deren Emission auf das Objekt fokussiert ist.

Die Figuren 6 und 7 illustrieren Simulationsergebnisse zum Einsatz eines Fluoreszenzmikroskops gemäß Figur 4. Die Lichtintensität ist hier als Schwärzung dargestellt. Aus drucktechnischen Gründen ist die Bildqualität eingeschränkt. Zur besseren Sichtbarmachung der Beleuchtung wurde im Objekt (Figur 6a, 7a) eine konstante Hintergrundfluoreszenz angenommen. Figur 6a zeigt das simulierte Objekt, dessen Beleuchtung mit dem beschriebenen Verfahren und Abbildung mit einem Epifluoreszenzmikroskop simuliert wurde. Die Teilbilder b-h repräsentieren Simulationen von jeweils mit verschiedenen Phasen des beleuchtenden Streifenmusters aufgenommenen Teilbildern. Figur 6i zeigt ein Beispiel, bei dem auch die Richtung des beleuchtenden Musters verändert wurde. Die Anregungsintensität war bei diesen Simulationen um den Faktor 5 größer als die Sättigungsintensität. Die maximal erwartete Photonenzahl betrug 560 Photonen/Pixel in den Einzelbildern. Figur 7 zeigt die zugehörigen Rekonstruktionsergebnisse. Figur 7a wiederholt das Originalbild der Simulation. Nach Faltung mit der Punktbildfunktion eines simulierten Mikroskops und einer Poisson-verteilten Verrauschung (Max = 560 Photonen) ergibt

sich das Bild Figur 7b. Die erfindungsgemäße Rekonstruktion aus Teilbildern, die analog zu den Figuren 6b bis 6h mit Beleuchtungsmustern unter 3 Drehwinkeln simuliert wurden, ist in Figur 7c gezeigt. Dabei ist keine Verstärkung hoher Raumfrequenzen vorgenommen wurden. Erfolgt zusätzlich die dem System eigene Hochfrequenzverstärkung, so ergibt sich aus Figur 7c das Bild gemäß Figur 7e. Die Anwendung einer entsprechenden Hochfrequenzverstärkung bei dem (konventionellen) Bild gemäß Figur 7b würde lediglich ein Bild mit gemäß Figur 7d ergeben. Der Vergleich der Bilder Figur 7e und Figur 7d zeigt die Überlegenheit des erfindungsgemäßen Verfahrens der Rekonstruktion hoher Raumfrequenzen aus der Aufnahme mehrerer Teilbilder. Figur 7f illustriert den zugehörigen simulierten Träger der mit dem Verfahren erreichten OTF bei einer berücksichtigten Anzahl von $Z = 7$ Maxima.

Figur 8 illustriert die Verbesserung des Auflösungsvermögens mit dem erfindungsgemäßen Verfahren. Es ist die Intensität auf einer Bezugslinie entlang der zweiten senkrechten Spalte in der Punktmatrix (links oben im Originalbild) in den Figuren 7d und 7e dargestellt. Die durchgezogene Linie entspricht dem Ergebnis des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Einzelpunkte sind deutlich als Maxima erkennbar. Mit dem herkömmlichen Verfahren (Epifluoreszenz mit nachfolgender Hochfrequenzverstärkung) ist nur der erste Punkt (teilweise) und ein Maximum zwischen den beiden untersten Punkten erkennbar. Bei der simulierten Abbildung eines Punktes ergibt sich eine Verbesserung des Auflösungsvermögens um einen Faktor von mehr als 3.

Figur 9 zeigt einen lateralen Schnitt durch die simulierte effektive optische Transferfunktion des Gesamtsystems gemäß Figur 4. Der Gitterabstand des Beugungsgitters wurde hier so gewählt, dass nur die Beugungsordnungen 0, +1 und -1 des Beu-

gungsgitters durch das Objektiv übertragen werden können. Durch die teilweise Sättigung der beteiligten Farbstoffe ergibt sich eine nicht-lineare Beziehung zwischen der Anregungsintensität und der Wahrscheinlichkeit der Anregung eines Farbstoffmoleküls an einem Punkt im Objektraum. Diese räumlich variierende Anregungswahrscheinlichkeit wird auch als Anregungsmuster bezeichnet. Wenn man annimmt, dass die Anregungswahrscheinlichkeit für ein bestimmtes Farbstoffmolekül eine Funktion der Anregungsintensität ist, so führt eine Nicht-Linearität dieser Funktion dazu, dass im Emissionsmuster auch räumlich höhere Harmonische des Anregungsmusters auftreten. Maxima im reziproken Raum, die jenseits der durch die Abbe-Grenze gegebenen Raumfrequenzbegrenzung liegen, können dann im Anregungsmuster auftreten. Die raumfrequenzbegrenzte Abbildung der Multiplikation der Farbstoffverteilung mit dem Anregungsmuster enthält nun Komponenten analog zu einer linearen Anregung mit einem Muster, welches höhere Raumfrequenzen enthält.

In Figur 9 ist im Einzelnen zu erkennen, dass die Transferfunktion bei einer herkömmlichen Abbildung mit einem Mikroskopobjektiv (mit nachfolgender Anwendung einer Hochfrequenzverstärkung) entsprechend der durchgezogenen Linie relativ schmal ist, wohingegen die Transferfunktion bei Anwendung der gesättigten Beleuchtung (mit einer Hochfrequenzverstärkung) erheblich erweitert wird (gestrichelt gezeichnet).

Figur 10 zeigt eine simulierte Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens auf ein mittels Elektronenmikroskopie aufgenommenes Schnittbild des Zellkerns einer embryonalen Bovin-Zelle. Figur 10a illustriert den invertierten elektronenmikroskopischen Ausschnitt nahe der Kernhülle mit der Kernmatrix („Nuclear Matrix“). Die simulierte epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit Entfaltung ergibt das in Figur

10b gezeigt herkömmliche Bild. Bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ergibt sich das in Figur 10c gezeigte Bild. Das mit der Methode der gesättigten lateralen Modulation aufgenommene und ausgewertete und anschließend entfaltete Bild (Maximum: 560 Photonen im Einzelbild) ist gegenüber dem herkömmlichen Bild deutlich verbessert und mit dem elektronenmikroskopischen Originalbild vergleichbar.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Zeichnungen und den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung einer Objektabbildung mindestens eines Objekts (40), wobei mindestens zwei Teilbilder des Objekts (40) unter jeweils verschiedenen Objektbedingungen aufgenommen werden, die am Objekt mit räumlichen Mustern ausgebildet sind, wobei jeweils für einen Objektpunkt eine nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt her detektierten Lichtes von den am Objektpunkt gegebenen Objektbedingungen besteht und die Teilbilder unterschiedliche Beträge verschiedener Raumfrequenzanteile der Objektstruktur enthalten, und aus den Teilbildern durch Rekonstruktion der Raumfrequenzanteile die gewünschte Objektabbildung ermittelt wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem räumliche Muster mindestens einer Objektbedingung gebildet werden, für die jeweils die nicht-lineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt ausgehenden und detektierten Lichtes besteht.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem räumliche Muster von mindestens zwei Objektbedingungen gebildet werden, für die eine Abhängigkeit des detektierten Lichtes von einer multiplikativen Verknüpfung der Objekteigenschaften und eine lineare oder eine nicht-lineare Abhängigkeit des detektierten Lichtes von jeder der Objektbedingungen besteht.
4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das räumliche Muster durch ein Muster einer Beleuchtungsintensität am Objekt (40) gegeben ist und das Objekt (40) mit dem Muster der Beleuchtungsintensität so beleuchtet wird, dass eine nicht-lineare Abhängigkeit der an einer Detek-

toreinrichtung (60) erfassten, von einem Objektpunkt ausgehenden Lichtintensität zu der an diesem Objektpunkt gegebenen Beleuchtungsintensität besteht.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die nicht-lineare Abhängigkeit des erfassten Lichts durch eine Sättigung von Fluoreszenzlicht von Fluorophoren unter intensiver Beleuchtung, eine Sättigung der Absorption von Beleuchtungslicht unter intensiver Beleuchtung, eine Abhängigkeit der Phase des emittierten oder gestreuten Lichtes von der im Objekt vorhandenen Beleuchtungsintensität, SHG- oder THG-Prozesse, eine Abhängigkeit der Lichteigenschaften der Ramanstreuung vom Wert einer oder mehrerer Objekteigenschaften, zeitlich kohärente Effekte an Atomen oder Molekülen im Objekt (40), eine Mehrphotonenabsorption, CARS-Prozesse, eine stimulierte Emission, eine Besetzung langlebiger Zustände oder chemisch veränderter Zustände, strahlende oder strahlungslose Energietransferprozesse von Fluorophoren auf benachbarte Fluorophore, am Objektpunkt gegebene räumlich inhomogene elektrische oder magnetische Felder, am Objektpunkt gegebene Drucke, Scherkräfte oder mechanische Spannungsverhältnisse, am Objektpunkt gegebene Temperaturen, am Objektpunkt gegebene chemische Verhältnisse und/oder zusätzliche Objektbestrahlungen mit elektromagnetischen Strahlen oder Schallwellen gebildet wird.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das räumliche Muster einer Objektbedingung im reziproken Raum durch eine Anzahl von Punkten, die in einer, zwei oder drei Dimensionen verteilt sind, beschrieben oder annähernd beschrieben werden kann bzw. im Ortsraum räumlich periodisch oder näherungsweise periodisch in einen oder mehreren Dimensionen gebildet wird.

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem zur Einstellung verschiedener Objektbedingungen das Objekt und das räumliche Muster in einer oder mehreren Richtungen relativ zueinander verschoben werden.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, bei dem das Muster durch eine Maske oder durch Interferenz erzeugt wird und eine Verschiebung des Musters durch Verschiebung der Phase verschiedener Beugungsmaxima erzielt wird.

9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Objektbedingungen entsprechend einer vorbestimmten zeitlichen Struktur verändert und die Teilbilder zu unterschiedlichen Zeiten aufgenommen werden.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, bei dem zur Erzeugung verschiedener Objektbedingungen die Beleuchtungsintensität variiert wird.

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Rekonstruktion der Objektabbildung aus den Teilbildern durch Lösung eines Gleichungssystems unter Berücksichtigung der nicht-linearen Abhängigkeiten oder durch eine iterative Verfahrensweise erfolgt.

12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Position des Objekts oder eines oder mehrerer Teilobjekte des Objekts (40) ermittelt werden.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Rekonstruktion der Objektabbildung unter Berücksich-

tigung einer vorbekannten Struktur des Objekts (40) oder von Teilen des Objekts (40) erfolgt.

14. Optisches Abbildungssystem (100) mit einer Beleuchtungseinrichtung (10) und einer Detektoreinrichtung (60), die dazu eingerichtet sind, ein Objekt (40) zu beleuchten bzw. eine Abbildung des Objekts (40) oder von Teilen des Objekts (40) aufzunehmen,

gekennzeichnet durch

mindestens einen Mustergenerator (20, 20', 20'') zur Erzeugung mindestens eines veränderlichen räumlichen Musters von Objektbedingungen am Objekt (40), wobei die Beleuchtungseinrichtung (10) und/oder der Mustergenerator (20, 20', 20'') dazu eingerichtet sind, Objektbedingungen zu erzeugen, von denen das mit der Detektoreinrichtung (60) detektierbare Licht nicht-linear abhängig ist, und einen Bildgenerator (70) zur Rekonstruktion einer Objektabbildung aus Teilbildern, die mit der Detektoreinrichtung (60) aufgenommen worden sind.

15. Optisches System gemäß Anspruch 14, bei dem der Mustergenerator (20, 20', 20'') eine Maske umfasst, mit der auf dem Objekt (40) ein räumliches Muster einer Beleuchtungsintensität gebildet werden kann.

16. Optisches System gemäß Anspruch 15, bei dem die Maske ein mehrdimensionales Beugungsgitter (22), ein Phasengitter, eine DMD-Einrichtung oder eine LCD-Matrix umfasst.

17. Vorrichtung gemäß Anspruch 15 oder 16, bei dem die Maske und die Probe (40) relativ zueinander verschiebbar und/oder drehbar angeordnet sind.

18. Optisches System gemäß Anspruch 14, bei dem der Muster-generator (20, 20', 20'') eine Spiegelanordnung (23 - 27) umfasst, die zur Erzeugung eines Interferenzmusters auf dem Objekt (40) eingerichtet ist.

19. Optisches System gemäß Anspruch 14, bei dem der Muster-generator (20, 20', 20'') eine Einrichtung zur Einstellung vorbestimmter physikalischer oder chemischer Bedingungen am Objekt (40) entsprechend dem räumlichen Muster umfasst.

20. Optisches System gemäß Anspruch 14, bei dem eine Verstelleinrichtung zu Verschiebung des Objekts (40) im räumlichen Muster der Objektbedingungen vorgesehen ist.

21. Optisches System gemäß einem der Ansprüche 14 bis 20, bei dem die Beleuchtungseinrichtung (10) eine Blitzlampe, einen Laser oder eine Hochdrucklampe umfasst.

22. Optisches System gemäß einem der Ansprüche 14 bis 21, bei dem eine Beleuchtungsoptik (30) und/oder eine Abbildungsoptik (50) vorgesehen sind.

23. Verwendung eines Verfahrens oder eines optischen Systems gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Kombination mit herkömmlichen optischen Mikroskopieverfahren, insbesondere in Kombination mit der Standard-Fernfeldmikroskopie, der Epifluoreszenzmikroskopie, der Konfokalmikroskopie, der 4Pi-Mikroskopie, der Theta-Mikroskopie, der Nahfeldmikroskopie, mikroskopischen I²M-, I³M- und I⁵M-Verfahren, STED-Verfahren, Multiphotonenmikroskopie, CARS-Verfahren und SHG- oder THG-Mikroskopie.

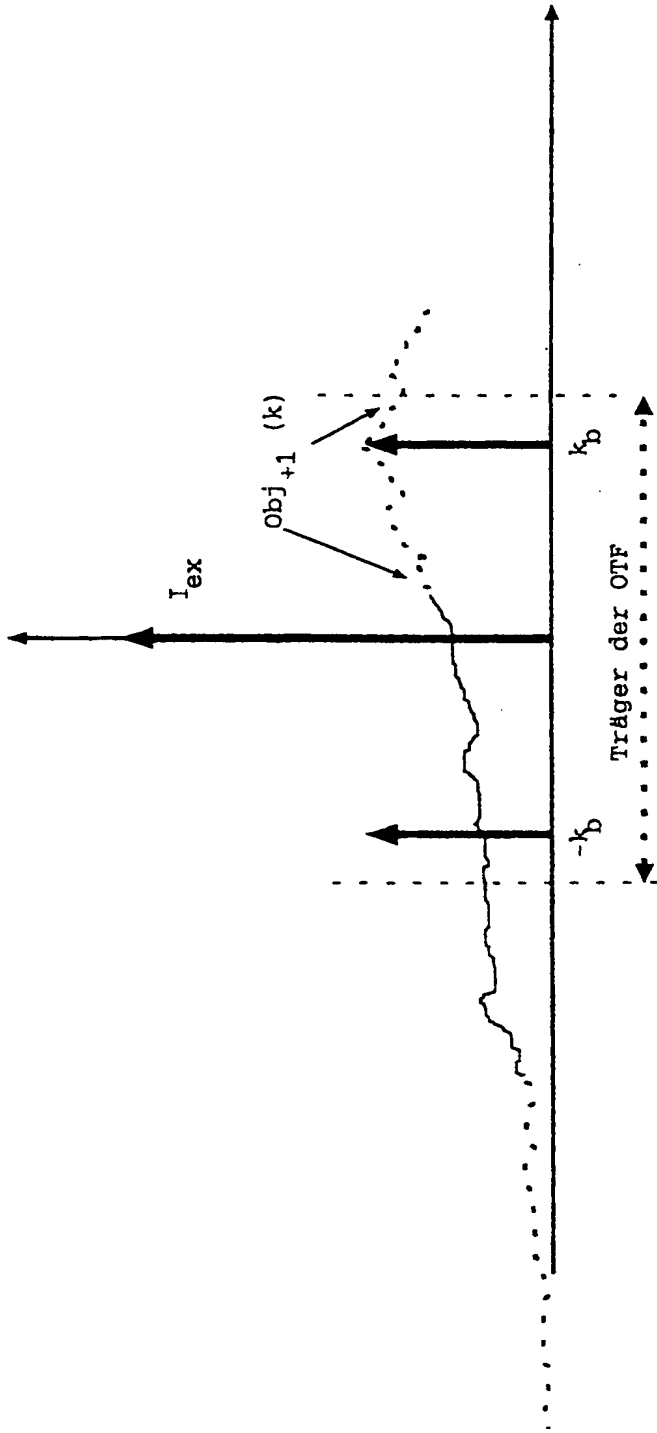


Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

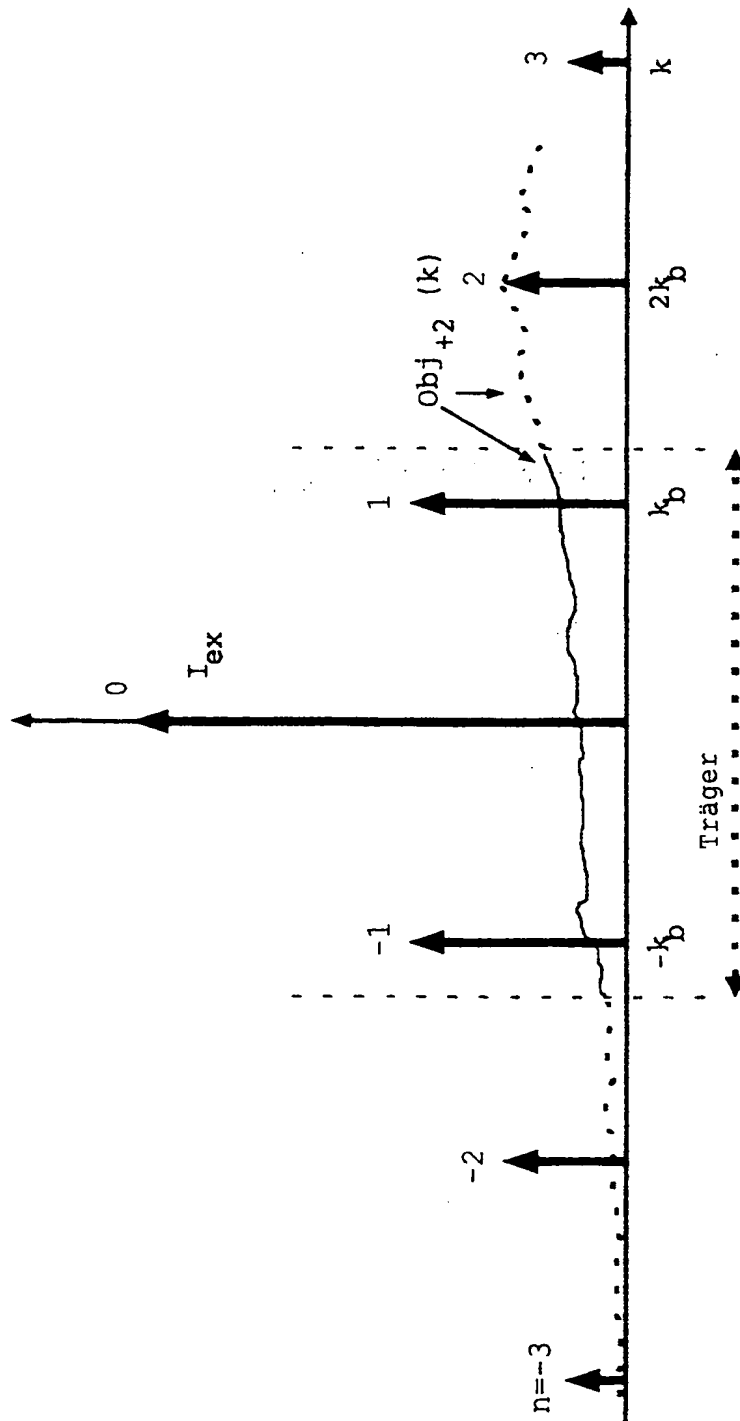


Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

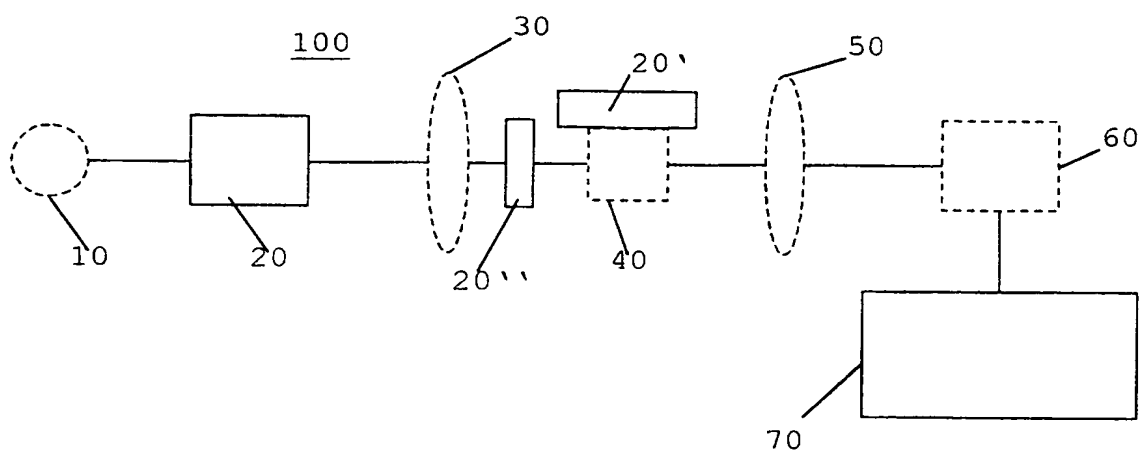


Fig. 3

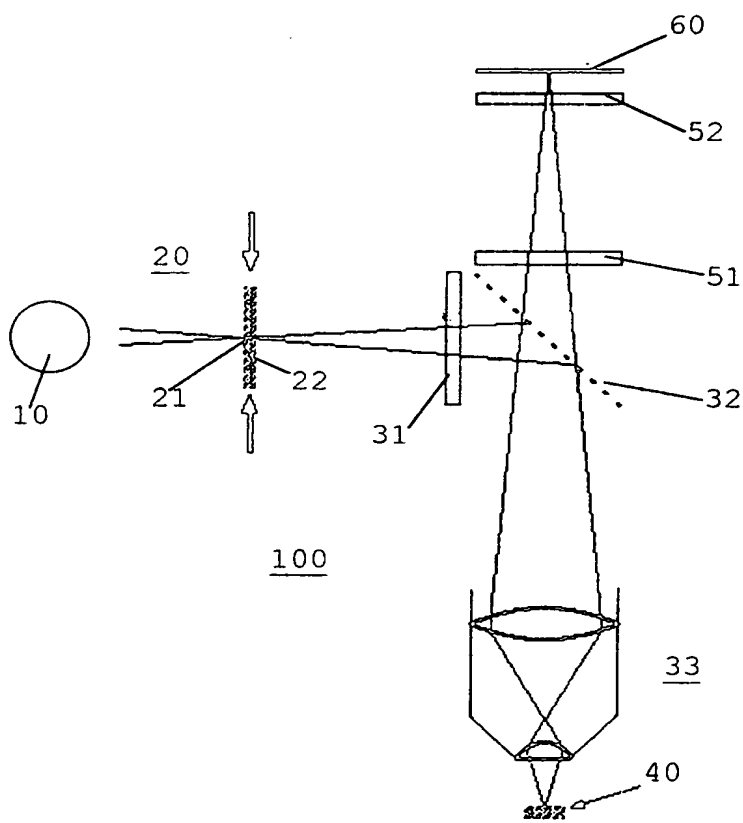


Fig. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

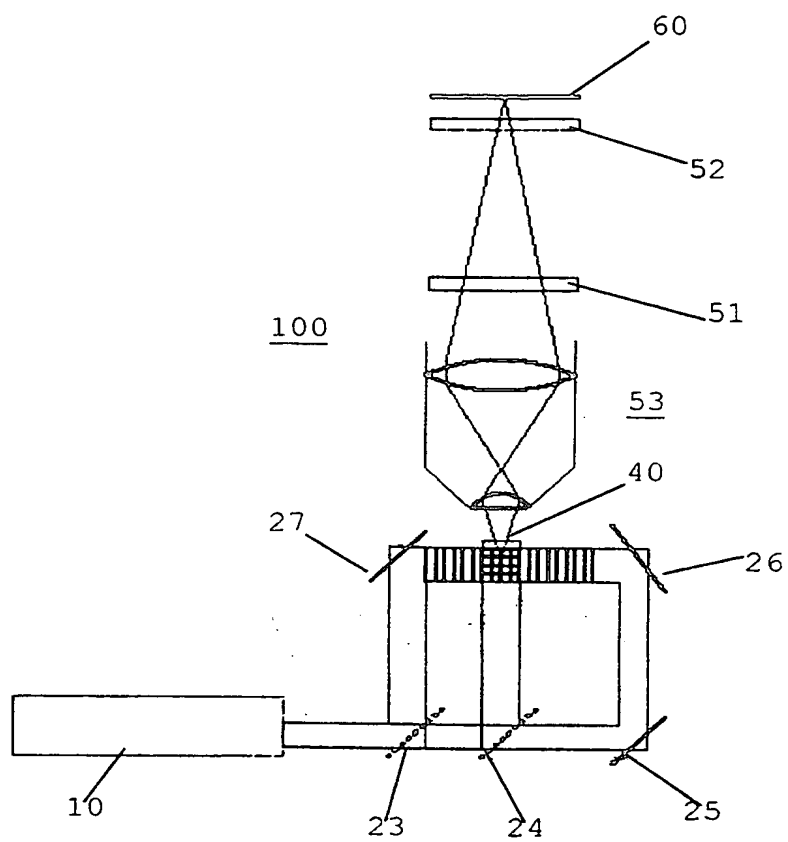


Fig. 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

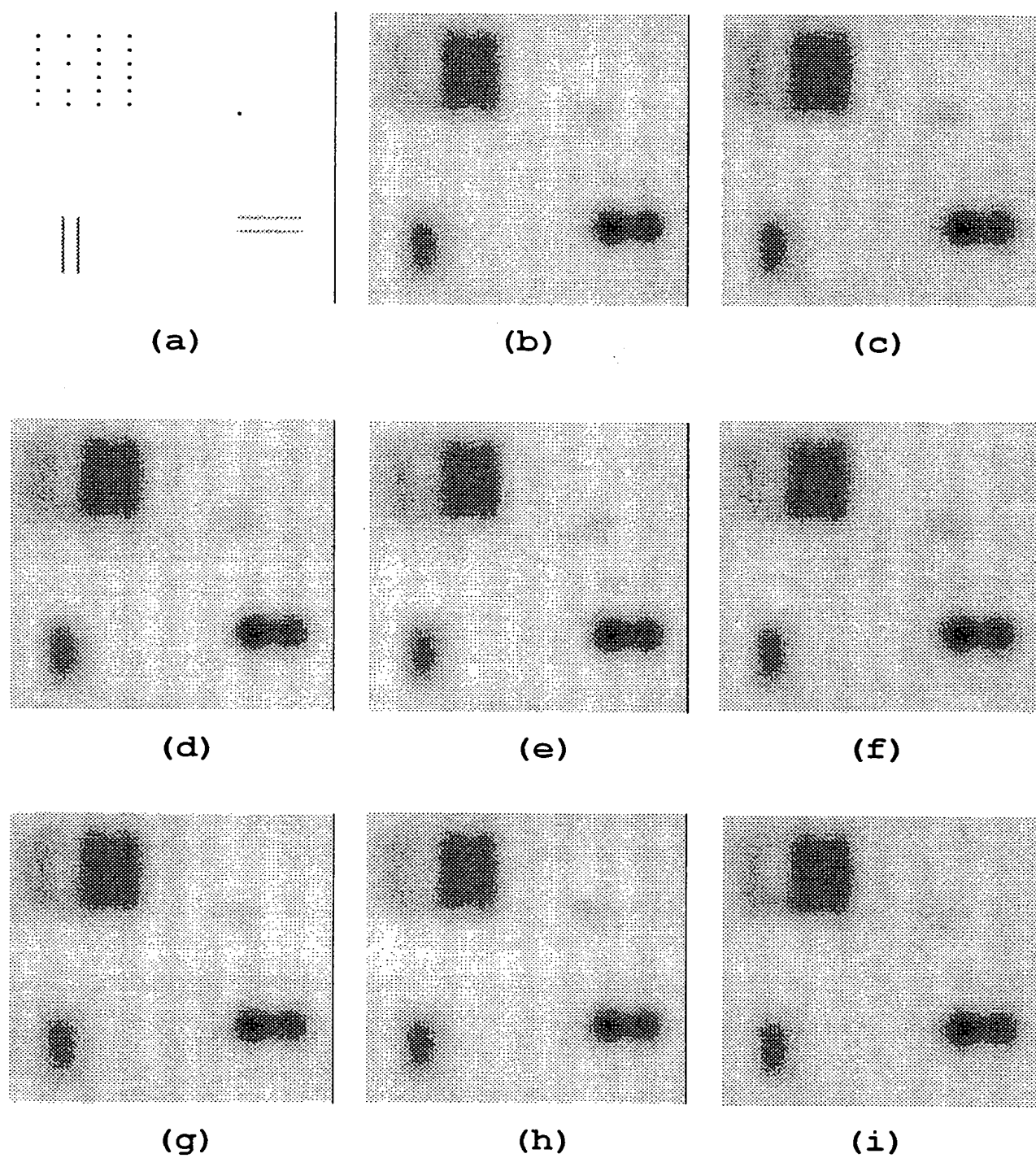


Fig. 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

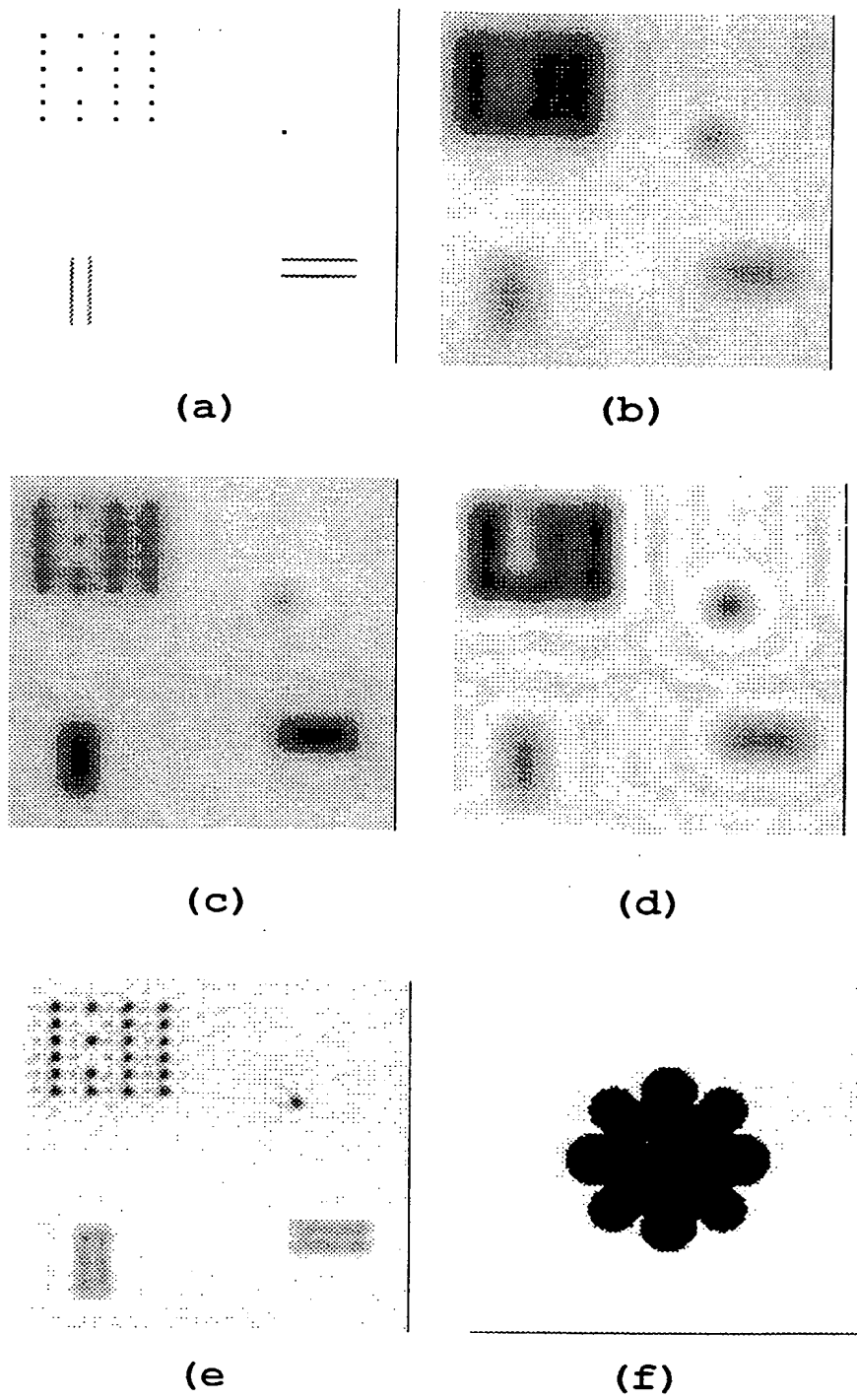


Fig. 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

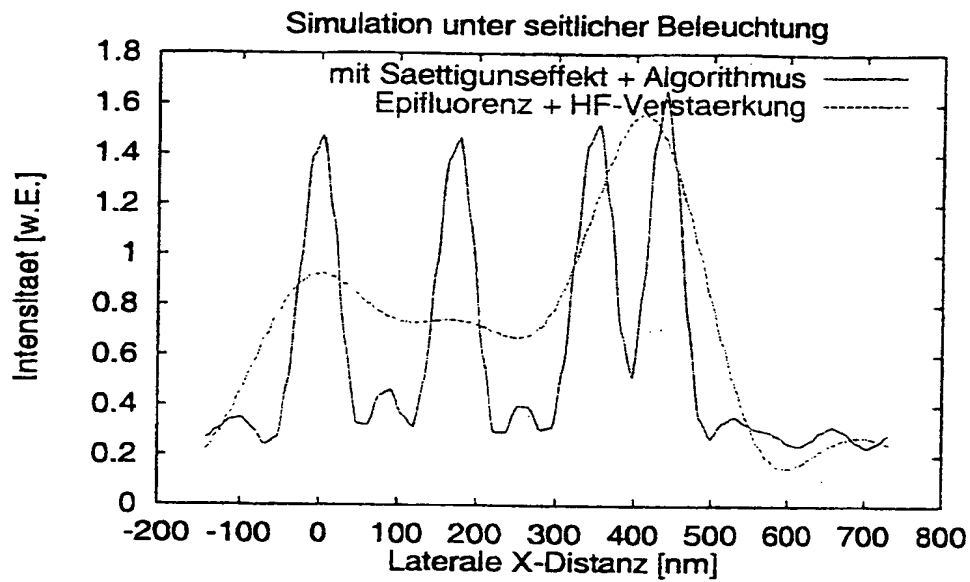


Fig. 8

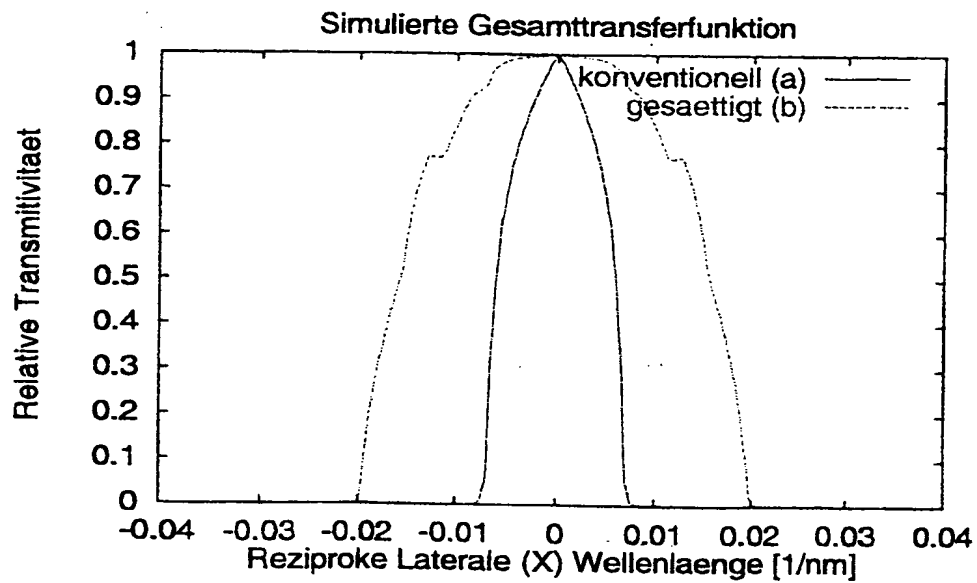
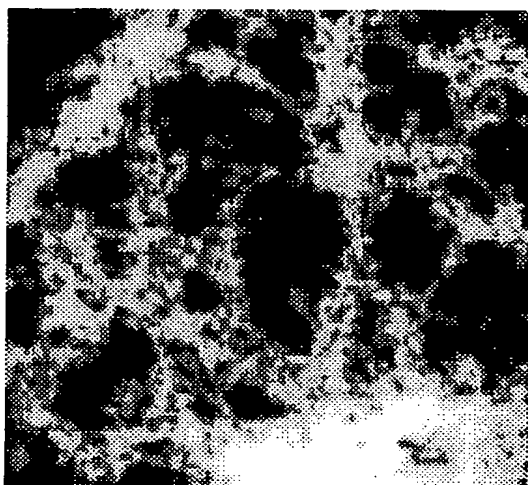
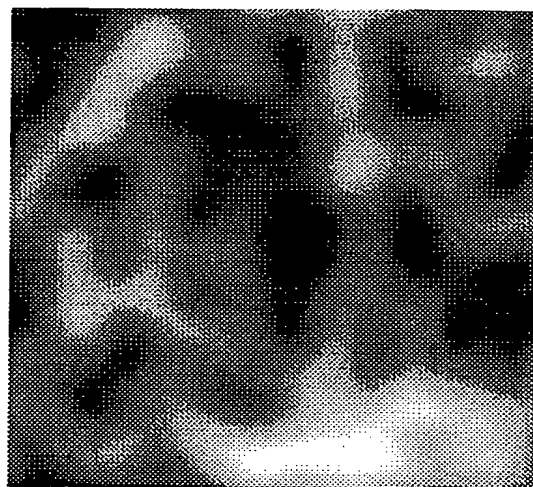


Fig. 9

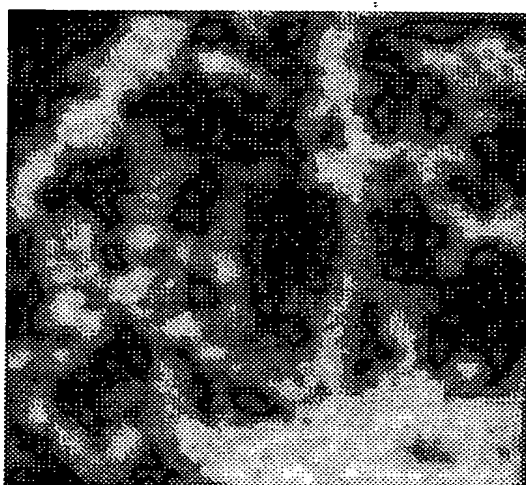
THIS PAGE BLANK (USPTO)



(a)



(b)



(c)

Fig. 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)